



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Ingeniería Geológica, Minería, Metalúrgica y
Geográfica
Unidad de Posgrado

**Evaluación de la biosorción de Pb en hongos
filamentosos del distrito de Santa Bárbara de
Carhuacayán, Yauli – Junín**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias
Ambientales con Mención en Gestión y Control de la
Contaminación

AUTOR

Henry Frans LLACZA LADERA

ASESOR

Dr. Pedro Luis CASTELLANOS SANCHEZ

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Llacza, H. (2021). *Evaluación de la biosorción de Pb en hongos filamentosos del distrito de Santa Bárbara de Carhuacayán, Yauli – Junín*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ingeniería Geológica, Minería, Metalúrgica y Geográfica, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	HENRY FRANS LLACZA LADERA
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41550641
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-6994-3347
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	PEDRO LUIS CASTELLANOS SANCHEZ.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09649588
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-2965-174X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	JORGE LEONARDO JAVE NAKAYO
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	01066653
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	NORA ROSA CONCEPCION MALCA CASAVILCA
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08129250
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	DORA ISABEL PINO ARANA
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	21561683
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	PEDRO LUIS CASTELLANOS SANCHEZ.
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	09649588
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.2.1 Biorremediación y Bioconversión
Grupo de investigación	Trabajo desarrollado de manera individual.
Agencia de financiamiento	Laboratorio de Micología Aplicada. FCB-UNMSM
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de micología aplicada, FCCBB – UNMSM. País: Perú. Departamento: Lima. Provincia: Lima. Distrito: Cercado de Lima. Centro poblado: N.A. Urbanización: Urb. Roma. Manzana y lote: Ciudad Universitaria. Calle: Cruce Av. Venezuela con Av. Universitaria Latitud: -12.060020000
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018 - 2021
URL de disciplinas OCDE	Biorremediación, Biotecnologías de diagnóstico en la gestión ambiental. http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.08.02



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

SUSTENTACIÓN PÚBLICA

En la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Lima, a los dieciséis días del mes de noviembre del año 2021, siendo las 15:00 horas, se reúnen los suscritos Miembros del Jurado Examinador de Tesis, nombrado mediante Dictamen N° 000495-2021-UPG-VDIP-FIGMMG/UNMSM del 06 de noviembre del 2021, con la finalidad de evaluar la sustentación virtual al amparo de la Directiva de la UNMSM aprobada con Resolución Rectoral N°01357-R-20 de la siguiente tesis:

TÍTULO

«EVALUACIÓN DE LA BIOSORCIÓN DE Pb EN HONGOS FILAMENTOSOS DEL DISTRITO DE SANTA BÁRBARA DE CARHUACAYAN, YAULI – JUNÍN»

Que, presenta el Bach. **HENRY FRANS LLACZA LADERA**, para optar el **GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN CIENCIAS AMBIENTALES CON MENCIÓN EN GESTIÓN Y CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN**.

El Secretario del Jurado Examinador de la Tesis, analiza el expediente digital N° 06240-FIGMMG-2017 del 24 de julio del 2017, en el marco legal y Estatutario de la Ley Universitaria, acreditando que tiene todos los documentos y cumplió con las etapas del trámite según el «Reglamento General de Estudios de Posgrado», aprobado con Resolución Rectoral N° 04790-R-18 del 08 de agosto del 2018.

Luego de la Sustentación, se procede con la calificación de la Tesis, de acuerdo al procedimiento respectivo y se registra en el acta correspondiente en conformidad al Art. 100 del precitado Reglamento, correspondiéndole al graduando la siguiente calificación:

MUY BUENO (18)

Habiendo sido aprobada la sustentación virtual de la Tesis, el Presidente recomienda a la Facultad se le otorgue el **GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN CIENCIAS AMBIENTALES CON MENCIÓN EN GESTIÓN Y CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN** al Bach. **HENRY FRANS LLACZA LADERA**.

Siendo las 16:00 horas, se dio por concluido al acto académico.



Firmado digitalmente por JAVE
NAKAYO Jorge Leonardo FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 16.11.2021 18:03:22 -05:00

DR. JORGE LEONARDO JAVE NAKAYO
Presidente

DRA. NORA ROSA CONCEPCIÓN MALCA CASAVILCA
Secretario

DRA. DORA ISABEL PINO ARANA
Miembro



Firmado digitalmente por
CASTELLANOS SANCHEZ Pedro
Luis FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.11.2021 13:02:48 -05:00

DR. PEDRO LUIS CASTELLANOS SÁNCHEZ
Asesor

La presente tesis va dedicada a Dios, ya que sin él no se hubiera logrado concluir, a mis padres, por estar a mi lado brindándome su apoyo y sus consejos para hacer de mí una mejor persona, a mis hermanos por sus palabras y compañía.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, la cual me formo en mi etapa universitaria y ahora me permite conseguir un logro más en mi vida profesional.

A los profesores de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, por permitirme ampliar mis conocimientos en cada curso asistido.

A mi asesor el PhD. Pedro Luis Castellanos Sánchez, responsable del Laboratorio de Micología Aplicada - UNMSM, a quien le debo gran parte de la experiencia adquirida hasta ahora y permitirme usar las instalaciones del laboratorio para el desarrollo de esta tesis.

A los microbiólogos del laboratorio de Micología Aplicada, Mirko Lino y Margot Morales, por su apoyo y consejos durante el desarrollo de este trabajo.

Al Químico Abdon Villafuerte, por sus consejos durante el tratamiento de muestras.

A mis compañeros del laboratorio que acompañaron en el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación problemática	1
1.2 Formulación del problema	5
1.2.1 <i>Problema general</i>	5
1.2.2 <i>Problema específico</i>	5
1.3 Justificación teórica	6
1.4 Justificación práctica	7
1.5 Objetivos	8
1.5.1 <i>Objetivo general</i>	8
1.5.2 <i>Objetivos específicos</i>	8
2 MARCO TEÓRICO	9
2.1 Antecedentes de la investigación	9
2.2 Bases teóricas	13
2.2.1 <i>Impacto de la actividad minera en el suelo</i>	13
2.2.2 <i>Los cuerpos de agua y el impacto de la actividad minera</i> ..	14
2.2.3 <i>Metales pesados</i>	15
2.2.4 <i>Química del plomo (Pb)</i>	15
2.2.5 <i>Impacto ecológico del plomo</i>	16
2.2.6 <i>Remoción fisicoquímica de metales</i>	17
2.2.7 <i>Remoción biológica de metales</i>	19
2.2.8 <i>Interacción hongo y metales pesados</i>	25
2.2.9 <i>Quelación extracelular</i>	26
2.2.10 <i>Bioadsorción fúngica</i>	27
2.2.11 <i>Bioabsorción fúngica</i>	29
3 METODOLOGÍA	30

3.1	Tipo y diseño de investigación	30
3.2	Unidad de análisis	30
3.3	Población de estudio	31
3.4	Tamaño de muestra.....	31
3.5	Selección de muestra.....	31
3.6	Técnicas de recolección de datos.	31
3.6.1	Área de muestreo.....	31
3.6.2	Muestreo	32
3.6.3	Muestreo superficial	34
3.6.4	Aislamiento de hongos filamentosos.....	35
3.6.5	Evaluación del crecimiento fúngico expuesto a plomo (Pb) ..	36
3.6.6	Identificación de los hongos.....	37
3.6.7	Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)....	38
3.6.8	Evaluación de la biosorción de plomo por biomasa viva.....	40
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1	Análisis, interpretación y discusión de resultados.	42
4.2	Prueba de hipótesis	70
4.2.1	Hipótesis general.	70
4.2.2	Hipótesis específica	71
4.3	Presentación de resultados.....	73
4.3.1	Aislamiento de hongos del relave Carhuacayán.....	73
4.3.2	Influencia del plomo en el crecimiento de los hongos.....	73
4.3.3	Evaluación de la biosorción de plomo.....	74
	CONCLUSIONES.	75
	RECOMENDACIONES	76
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	ANEXOS:.....	90

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.* **Información geo-referencial en coordenadas UTM de las estaciones de muestreo del relave Carhuacayán.**
- Cuadro 2.* **Profundidad de muestreo según el uso del suelo.**
- Cuadro 3.* **91 hongos aislados del relave Carhuacayán, en tres zonas representativas cuadrícula 1, 2 y 3.**
- Cuadro 4.* **Frecuencia de crecimiento fúngico en agar Czapeck – plomo 1.25 g/l.**
- Cuadro 5.* **Frecuencia de crecimiento fúngico en agar Czapeck – plomo 1.75 g/l**
- Cuadro 6.* **Frecuencia de crecimiento fúngico en agar Czapeck – plomo 2.25 g/l.**
- Cuadro 7.* **Análisis de varianza al 95% confianza, para determinar diferencias en el promedio de crecimiento, relave Carhuacayán.**
- Cuadro 8.* **Prueba de TUKEY para determinar la diferencia en el promedio de crecimiento en el relave Carhuacayán.**
- Cuadro 9.* **Identificación de hongos seleccionados y evaluación del CMI.**

Cuadro 10 **Cepas seleccionadas que presentaron mejor crecimiento (mm) a tres concentraciones de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$).**

Cuadro 11 **Concentración Mínima inhibitoria (CMI) de hongos seleccionados expuestos al plomo.**

Cuadro 12 **Evaluación de la biosorción de plomo durante el crecimiento de tres hongos en cultivo líquido Czapeck – Plomo.**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1* **Concesiones mineras en el departamento de Yauli, Junín - 2016.**
- Figura 2* **Tolerancia de *Aspergillus niger* en 500 ppm de Ni, Co, Mo y V.**
- Figura 3:* **Tolerancia de *Aspergillus foetidus* en 500 ppm de Mn, Fe, W y Zn.**
- Figura 4* **Sorción de metales en las estructuras de la pared celular del hongo.**
- Figura 5* **Área de color parda dentro del relave Carhuacayán.**
- Figura 6* **Relave Carhuacayán predomina el color gris en toda el área.**
- Figura 7* **Excremento de ganado ovino de la zona en el relave Carhuacayán.**
- Figura 8* **Desmoronamiento y escurrimiento del relave Carhuacayán y flora limitada a los contornos del relave.**

- Figura 9* **Medición de profundidad, 10 cm.**
- Figura 10* **Toma de muestra en bolsas ziploc.**
- Figura 11* **Aislamiento por diluciones seriadas.**
- Figura 12* **Hongos aislados del relave minero.**
- Figura 13* **Crecimiento fúngico en, A: Agar Papa Dextrosa; B: Czapeck-plomo (1.25g/l); C: Czapeck- plomo (1.75 g/l) y Czapeck-plomo (2.25 g/l).**
- Figura 14* **Técnica del micro cultivo, incubación al 5to día en cámara húmeda CRH 522 género *Paecilomyces*.**
- Figura 15* **Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) 1405 género *Epidermophyton* A: 0; B: 1.25; C: 1.75; D: 2.25; E: 2.75 F: 3.25 G: 3.75 g/l de plomo (Pb).**
- Figura 16* **Crecimiento al sexto día de la cepa CRH 522 género *Paecilomyces* sembrado por triplicado en caldo de cultivo Czapeck – plomo (1ppm) para la evaluación de biosorción de plomo.**

- Figura 17* **Cuadrícula 1 (C1) y muestras en los cuadrantes 3, 4, 9, 16 y 20.**
- Figura 18* **Cuadrícula 2 (C2) y muestras en los cuadrantes 3, 12, 13, 15 y 24.**
- Figura 19* **Cuadrícula 3 (C3) y muestras en los cuadrantes 2, 3, 5, 6 y 17.**
- Figura 20* **Influencia del plomo a tres concentraciones en el crecimiento de los hongos, relave Carhuacayán.**
- Figura 21* **Evaluación de la tolerancia de los hongos frente a tres concentraciones de plomo, relave Carhuacayán.**
- Figura 22* **Cepa CRH1408 Género *Paecilomyces*, A: macrocultivo B: microcultivo.**
- Figura 23* **Cepa CRH1409 Género *Paecilomyces*, A: macrocultivo B: microcultivo.**
- Figura 24* **Cepa CRH522 Género *Paecilomyces*, A: macrocultivo B: microcultivo.**
- Figura 25* **Cepa CRH303 Género *Paecilomyces*, A: macrocultivo B: microcultivo.**

- Figura 26* **Cepa CRH1405 Género *Epidermophyton*, A: macrocultivo B: microcultivo.**
- Figura 27* **Cepa CRH423 género *Acremonium*, A: macrocultivo B: microcultivo.**
- Figura 28* **Cepa CRH1411 género *Acremonium*, A: macrocultivo B: microcultivo.**
- Figura 29* **Cepa CRH302 género *Scopulariopsis*, A: macrocultivo B: microcultivo.**
- Figura 30* **Cepa CRH508 género *Penicillium*, A: macrocultivo B: microcultivo.**
- Figura 31* **Cepa CRH401 no identificada, A: macrocultivo B: microcultivo.**
- Figura 32* **Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del crecimiento de los hongos seleccionados en medio Czapeck – (Pb (NO₃)₂), pH 5.5.**
- Figura 33* **Biosorción de plomo de tres cepas nativas fúngicas, en seis días de evaluación.**

RESUMEN

El plomo es uno de los contaminantes que afecta a los ríos y suelos en el distrito de Santa Bárbara Carhuacayán y una de las fuentes de contaminación es la relavera ubicada cerca de la desactivada mina Carhuacayán. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la biosorción de plomo en hongos filamentosos aislados del relave Carhuacayán, para lo cual se realizaron muestreos en tres áreas representativas de la relavera, de donde se aislaron hongos mediante los siguientes pasos; diluciones serias en caldo Yeast, Peptone, Glucose (YPG), purificación en agar, papa, dextrosa (APD) y conservación en cepario con APD. La influencia del plomo en el crecimiento de los 91 hongos aislados fue evaluada en agar Czapeck-Pb a tres concentraciones (1.25, 1.75 y 2.25 g/l) de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, para poder determinar la diferencia en el crecimiento en las tres concentraciones se realizó el análisis ANOVA a un 95% de confianza reveló que el promedio de crecimiento de los hongos en las tres concentraciones de plomo por lo menos uno es diferente luego se complementó con la prueba TUKEY determinando con una Honestly Significant Difference (HSD) de 4.96 que los promedios de crecimiento en las concentraciones evaluadas son diferentes entre sí. Seleccionamos diez cepas para determinar su concentración mínima inhibitoria (CMI), de las cuales tres cepas que presentaron mejores valores de CMI: CRH-522 *Paecilomyces* sp. (3.25 g/l); CRH-303 *Paecilomyces* sp. (3.25 g/l); CRH-1405 *Epidermophyton* sp. (3.75 g/l) estas tres cepas pasaron a ser evaluadas en su capacidad de biosorción de plomo en caldo de cultivo Czapeck suplementado con una concentración de plomo aproximada de 1 mg/l, las cepas presentaron los siguientes porcentajes de biosorción: CRH-522 *Paecilomyces* sp. (88%); CRH-303 *Paecilomyces* sp. (89%) y CRH-1405 *Epidermophyton* sp. (81%) al sexto día de crecimiento. Se concluye que en el relave Carhuacayán existen hongos filamentosos con propiedad de tolerancia y biosorción de plomo y tienen el potencial para ser empleados en técnicas de biorremediación.

Palabras clave: Hongo, filamentoso, Biosorción, metal, Plomo, Czapeck.

ABSTRACT

Lead is one of the pollutants that affects rivers and soils in the Santa Bárbara Carhuacayán district and one of the sources of contamination is the tailings facility located near the deactivated Carhuacayán mine. The objective of this work was to evaluate lead biosorption in filamentous fungi isolated from the Carhuacayán tailings, for which samplings were carried out in three representative areas of the tailings, from where fungi were isolated by the following steps; Serial dilutions in Yeast broth, Peptone, Glucose (YPG), purification in agar, potato, dextrose (APD) and storage in stock with APD. The influence of lead on the growth of the 91 isolated fungi was evaluated on Czapeck-Pb agar at three concentrations (1.25, 1.75 and 2.25 g / l) of Pb (NO₃)₂, in order to determine the difference in growth in the three concentrations was performed ANOVA analysis at 95% confidence revealed that the average growth of the fungi in the three lead concentrations at least one is different then it was complemented with the TUKEY test determining with an Honestly Significant Difference (HSD) of 4.96 that the growth averages in the concentrations evaluated are different from each other. We selected ten strains to determine their minimum inhibitory concentration (MIC), of which three strains that presented better MIC values: CRH-522 *Paecilomyces* sp. (3.25 g / l); CRH-303 *Paecilomyces* sp. (3.25 g / l); CRH-1405 *Epidermophyton* sp. (3.75 g / l) these three strains were evaluated for their lead biosorption capacity in Czapeck culture broth supplemented with an approximate lead concentration of 1mg / l, the strains presented the following biosorption percentages: CRH-522 *Paecilomyces* sp. (88%); CRH-303 *Paecilomyces* sp. (89%) and CRH-1405 *Epidermophyton* sp. (81%) on the sixth day of growth. It is concluded that in the Carhuacayán tailings there are filamentous fungi with the property of tolerance and lead biosorption and have the potential to be used in bioremediation techniques.

Keywords: Fungus, filamentous, Biosorption, metal, Lead, Czapeck.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática

La contaminación por metales pesados, es en la actualidad, un problema ambiental mundial del siglo XXI debido a la pérdida de la calidad de suelo, agua y aire afectando directamente el hábitat de seres vivos y fuente de suministro del ser humano (Reyes et., al. 2016). Se calcula unos 2 000 millones de metros cúbicos de agua que se contamina diariamente poniendo en evidencia la crisis en la que se encuentra este recurso, el 2015 la Organización de Naciones Unidas (ONU) acordó: “Asegurar la disponibilidad y la gestión sostenible de agua y saneamiento para todos” con la finalidad de que los países miembros tomen acción en la recuperación de este recurso (ONU - DAES, 2005-2015).

Los residuos accionados por la actividad minera anteriormente eran depositados directamente en el suelo y en la ribera de los ríos ocasionando impactos severos sobre el hábitat de los seres vivos, la Mina Faro en Vangorda Yukón - Canadá es un ejemplo de la gravedad de la contaminación ambiental por cianuro, arsénico y metales pesados, se promedia una inversión de 450 millones de dólares además de una vigilancia de 500 años para su recuperación (Oyarzun, et., al. 2011; Munson, 2011).

Los relaves mineros son uno de los desechos en los procesos mineros, por lo general están conformados por roca, metales, tierra y agua, además de los materiales mencionados llevan aditivos químicos empleados para la recuperación de metales, que al disponerlos en áreas destinadas para relave se pueden mantener en el horizonte superficial dependiendo de la capacidad de intercambio catiónico del suelo los vegetales pueden extraerlos por lo que ocasionan la alteración negativa en los organismos del ecosistema durante las

actividades extractivas mineras (Astete et al., 2009; Romero et al., 2008), ocasionalmente son depositados cerca de las riberas de los ríos, escurriendo los contaminantes a los suelos, sedimentos y cuerpos de agua (Cano et al., 1997; Huaranga et al., 2012), de esta manera la población que vive cerca de alguna actividad industrial donde se procesan o extraen metales pesados se encuentran afectadas por la contaminación. La aldea de Vila Mota ubicado en el Valle de Ribeira al sureste de Brasil fue gravemente afectada por la empresa dedicada a la fundición de metales, encontraron que el 100% de las verduras, hortalizas y huevos de la aldea arrojaron concentraciones de plomo superiores a 0,5 mg/kg límite establecido por la normativa brasileña (Lammoglia et al., 2010). La contaminación por metales pesados de una cuenca hidrográfica está considerada como un impacto irreversible de alto costo y no puede recuperarse a corto plazo.

El 2019 el Perú vivió el boom minero registrando importantes ingresos fiscales, en ese contexto, la región Junín se consolidó como el tercer generador de plomo, plata y el cuarto de zinc, la provincia de Yauli - Junín presenta la mayor cantidad de concesiones mineras entregados a las empresas privadas (CONAMI, 2010) con el 72.2% de sus territorios hasta el 2016 (ver figura 1).

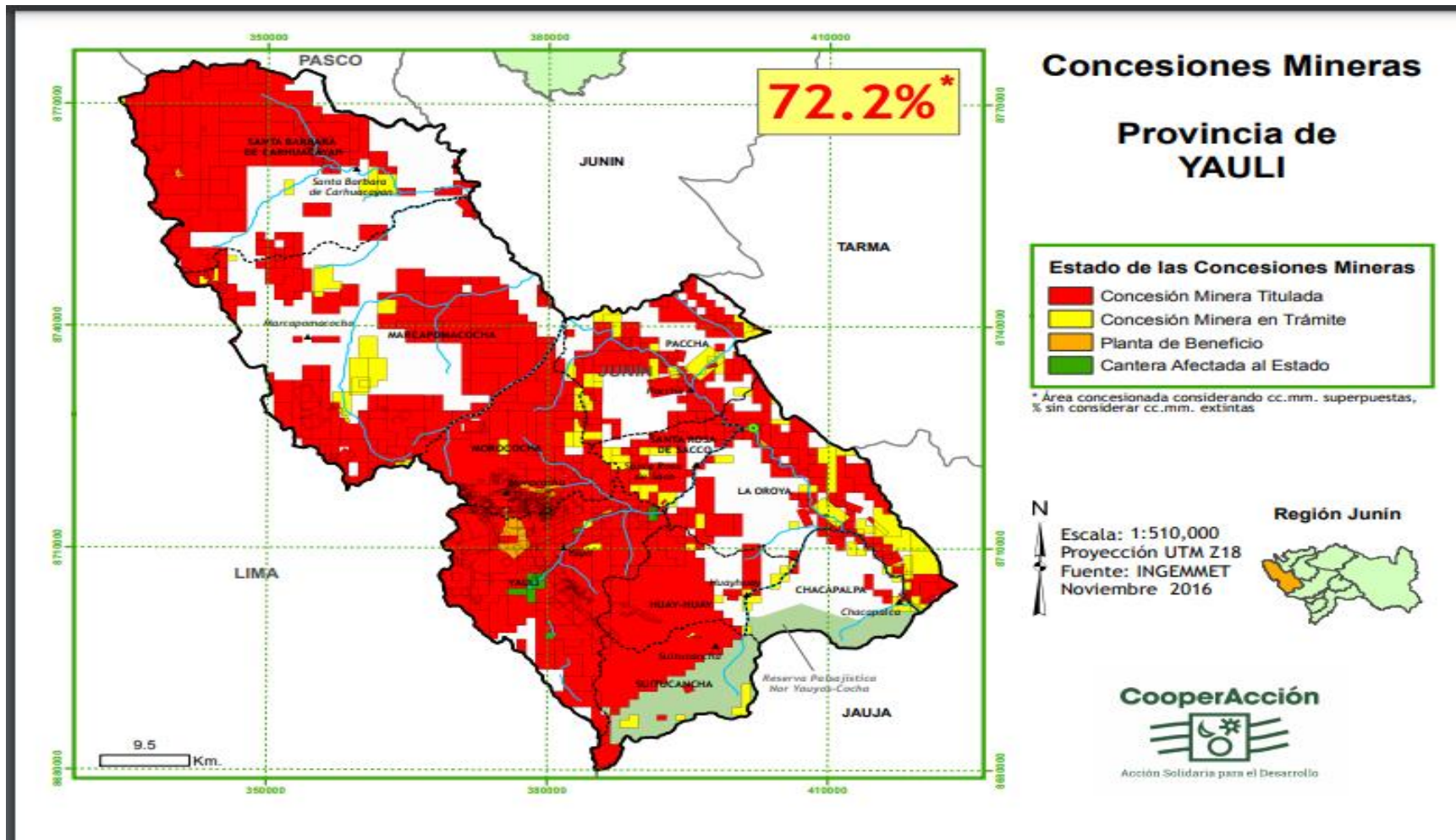


Figura 1 Concesiones mineras en el departamento de Yauli, Junín - 2016. Fuente. Datos tomados de CooperAcción, mapas de concesiones.

El 2005 la Universidad San Luis de Missouri - EEUU, presento un informe sobre las consecuencias de la actividad metalúrgica en donde se revelaba que el 99% de la población infantil de La Oroya, Junín – Perú presentaron concentraciones mayores a 10 ug/dl de plomo en sangre, concentración mínima en sangre recomendada por la OMS hasta el año 2018. Comunidades de Quiulacocha y Champamarca – Pasco, también han sido afectadas con presencia de este metal causando enfermedades como desnutrición crónica, anemia y retardo mental (Astete *et al.*, 2009). Consecuencia de este informe, en el año 2006 la ciudad de La Oroya fue calificada por el Instituto Blacksmith, Nueva York – Estados Unidos como una de las diez ciudades más contaminadas del mundo (CONACAMI, 2010).

El 2005 un informe del Banco Mundial reportó sobre el problema ambiental minero en el Perú, en donde con 84 puntos la consideran a el distrito de Santa Bárbara de Carhuacayán, Yauli - Junín, en cuarto lugar, con muy alto riesgo, al presentar 20 pasivos ambientales impactando la cuenca del río Mantaro, el ranking indicó que el distrito cuenta con el mayor número de pasivos ambientales que no están remediados, además de no tener identificadas a las empresas mineras que contaminaron el medio ambiente (Ríos, 2012).

La desactivada mina Carhuacayán que presenta vetas de sulfuros de Pb, Zn, Cu y Ag, fue minada entre los años 1964 y 1983, de donde se extrajo alrededor de 1,5 millones de toneladas. El legado de la actividad minera de los años de explotación son 94 pasivos ambientales mineros (PAM) entre bocaminas (20), desmonteras (escombreras, 18), relaveras (balsas de estériles, 2) y chimeneas (31) entre otras (CONGEO, 2018).

1.2 Formulación del problema

1.2.1 *Problema general*

- ¿Cómo la presencia de hongos con potencial biotecnológico que tengan la propiedad de tolerar y sorber plomo en la relavera Carhuacayán influirán en la contaminación producida por este pasivo ambiental?

1.2.2 *Problema específico.*

- ¿Qué especies de hongos tolerantes a plomo existirán en el relave Carhuacayán?
- ¿Cómo influirá el plomo en el crecimiento de los hongos del relave Carhuacayán?
- ¿Cuánta capacidad de biosorción de interés biotecnológico presentarán los hongos del relave Carhuacayán?

1.3 Justificación teórica

La contaminación generada por los 20 pasivos ambientales pasivos ambientales en el distrito de Santa Bárbara de Carhuacayán, así como en otras localidades del ande peruano donde se desarrolla actividad minera, es un problema que afecta a los ríos y suelos (Ríos, 2012). Los contaminantes como el plomo (3 844.4 ppm) y zinc (8 810.4 ppm) son dispersados por escurrimiento producto de la lluvia de la zona sumado a la inhibición de la vida en el Rio Carhuacayán (Llacza y Castellanos, 2020), la flora y fauna (ganado ovino) se encuentra afectada por estos contaminantes que será consumido en el pueblo de Santa Barbara de Carhuacayán (Reyes et., al. 2016).

Ante este problema existen métodos químicos en fuentes hídricas tales como: oxido-reducción, filtración, tratamiento electroquímico, precipitación, intercambio iónico, tecnologías de membrana y recuperación por evaporación las cuales son poco efectivos a bajas concentraciones, debajo de 100 mg/l y de alto costo (Enamorado et., al. 2011). La utilización de microorganismos como hongos, algas, bacterias y cierta flora acuática en la biosorción de metales pesados ofrece una mejor alternativa con respecto a los métodos comúnmente empleados en los procesos de purificación y recuperación de metales tóxicos o de interés económico presentes en aguas residuales o contaminadas (Cañizares, 2000).

Los hongos incluidos las levaduras, han recibido una especial atención por su eficiencia en secuestrar metales pesados de soluciones acuosas diluidas, su disposición en alta cantidad de biomasa celular, residuos producidos por actividad industrial, bajo costo de producción, una excelente propiedad de unión a metales y la poca cantidad de biomasa empleada para los tratamientos hacen de estos organismos ideales para desarrollar tecnologías limpias “verde o ecológica” de remediación y recuperación de contaminantes mineros, contribuyendo a la recuperación de los ecosistemas perdidos (Salman, 2014).

Cepas fúngicas que se aplican en la biosorción de metales pesados, Cárdenas et al. (2013) en México como *Mucor rouxii* IM-80, *M. rouxii* mutante y *Mucor sp-1* y 2 con porcentajes de biosorción de 100%, 94.1%, 93.1% y 86.3 %; Bayas y López (2017) en Ecuador realizaron una comparación entre *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum* con respecto a su capacidad de disminuir concentraciones de metales pesados de lodos de lixiviación provenientes de un relleno sanitario, los resultados mostraron que *T. harzianum* remueve cobre en 53,7%, plomo 38,9%, zinc 33,5% mientras que *P. ostreatus* remueve cobre un 46,3%; Plomo 43,1%; Zinc 31,2%.

1.4 Justificación práctica

En el Perú se identificaron hasta el 2004 una cantidad de 611 pasivos ambientales por el Ministerio de Energía y Minas (Dancé y Sáenz, 2013), este problema es una oportunidad para la Sociedad Nacional de Minería Petróleo y Energía, pues existe la posibilidad de desarrollar biotecnologías de recuperación de metales de interés económico con cepas nativas aisladas de estos pasivos ambientales, permitirán minimizar el impacto negativo producido por las actividades de extracción, colocándolas bajo estándares sostenibles de explotación y aumentando sus ingresos por la recuperación de los metales preciosos.

Aislar organismos adaptados a ambientes altamente contaminados con capacidad de sorción de metales (Garcia et., al. 2002) permitirán a mineras como Volcan, Brocal, Huarón, Animón, San Cristóbal, Carahuacra, Morococha, Austra Duvas, Manuelita, Anticona, Calera Cut-off, Andaychaua, Marta, Huachocolpa, Julcani y Cobriza reducir la contaminación producida por las 100 000 toneladas de relaves por año que producen (SERVINDI, 2016).

Este estudio aisló hongos del relave Carhuacayán con propiedades de sorción de plomo para que puedan ser empleados en procesos biotecnológicos de recuperación de plomo, de esta manera contribuir al cumplimiento de los estándares de calidad de agua de acuerdo al DS 004 – 2017 MINAM, suelo DS N° 011-2017-MINAM y la ley N° 28271, ley que regula los pasivos ambientales de la actividad minera entre otros.

1.5 Objetivos

1.5.1 *Objetivo general.*

- Evaluar la tolerancia, crecimiento y la biosorción de plomo en hongos del relave Carhuacayán que sean de interés biotecnológico para reducir la contaminación por el pasivo ambiental.

1.5.2 *Objetivos específicos*

- Aislar hongos filamentosos del relave Carhuacayán que toleren la contaminación por plomo.
- Determinar la influencia de plomo en el crecimiento de los hongos filamentosos del relave Carhuacayán.
- Determinar la biosorción de plomo de los hongos aislados del relave Carhuacayán e interés biotecnológico.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Akinkunmi (2015), seleccionó hongos nativos aislados de suelo de manglares con potencial prometedor para remover metales pesados de soluciones acuosas. *Fusarium equiseti* UMAS A0 presentó óptimas condiciones de absorción de iones de plomo (II) y cobre (II) a pH 4 y pH 9, temperatura de 30°C, la concentración inicial de metal fue de 300 mg/l y 30 mg/l con 97.9 % y 17.7% de eficiencia de biosorción en 5 días, respectivamente y *Penicillium citrinum* UMAS B2 presentó las siguientes condiciones para absorción para el plomo (II) y cobre (II) el pH 7, temperatura de 30°C, concentración inicial de metal de 400 mg/l y 50 mg/l con 57.3% y 11.5% de eficiencia de biosorción respectivamente. La peroxidasa de manganeso y la lignina peroxidasa fueron las principales enzimas que se encontraron asociadas en la biosorción de los iones de plomo (II) y de cobre (II).

Espinoza y Ludeña (2007) aislaron en la provincia de El Oro, distrito minero de Zaruma - Ecuador una cepa de *Penicillium* sp., para ser evaluada en su capacidad de solubilizar cobre (Cu). Se empleó un medio mínimo enriquecido con sucrosa (5%, 10%, 15% y 20%) suplementado con Cu (10%), agitado por 28 días a 30°C y 110 rpm. Se tomaron muestras periódicas para determinar el consumo de glucosa, pH, ácido cítrico y cobre en la solución. 26.667ppm de Cu fue la solubilización biológica más alta, usando el 10 % de sucrosa.

Palacios y Villavicencio (2007), estudiaron dos cepas *Saccharomyces cerevisiae* una pertenece al cepario de la Universidad de las Américas, Puebla – México, denominada UDLAP-07 y la de venta comercial de nombre CM-05. Se realizaron curvas de crecimiento de las cepas UDLAP-07 y CM-05, en presencia y ausencia de plomo (Pb) y cadmio (Cd). También se determinó inmovilización de Pb y Cd por ambas cepas y estudio de la capacidad de biosorción de la cepa CM-05 empleando columna empacada con biomasa fúngica. En la primera parte de la investigación se demostró que la cepa CM-05 tiene un tiempo de generación mayor al de la cepa UDLAP-07, en cuanto al estudio de la capacidad de inmovilización de Pb y Cd se evidenció que la cepa CM-05 permite inmovilizar una mayor cantidad de metales. Las dos cepas de levadura presentaron una concentración mínima inhibitoria de ambos metales a 15 ppm, los ensayos empleando columnas empacadas con biomasa fúngica bajo las siguientes condiciones: sin tratamiento, tratamiento ácido y tratamiento alcalino. Las condiciones de tratamiento ácido y alcalino no influyeron significativamente en la capacidad de adsorción de plomo y cadmio.

Meza (2013), aisló y seleccionó hongos con resistencia a cromo (Cr-VI) y zinc (Zn-II) de suelo y sedimento de ambientes mineros cerca al río Yauli, Junín – Perú. Determinó la capacidad de bioadsorción mediante el método de difenil carbazida y espectrofotometría de absorción atómica (EAA). 46 cepas de hongos *Penicillium* sp (M2S2) y *Paecilomyces* sp. (M6A3), presentaron valores máximos de CMI de 1200 mg/l y 40000 mg/l para Cr (VI) y Zn (II) respectivamente. Para soluciones monometálicas, se encontró bioadsorción del 88.89% para Cr (VI) por *Paecilomyces* sp y 75.14% para Zn (II) para *Penicillium* sp., el hongo *Paecilomyces* sp presentó bioadsorción en solución bimetálica mayor al 65% para los dos metales, presentó mejores valores para Zn (II) con 72.82%. A las 48 horas la bioadsorción alcanzo su mayor valor para los dos metales.

Bayas y López (2017), realizaron un estudio comparativo en la disminución en la concentración de metales pesados entre los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum* en lodos de lixiviación provenientes de un relleno sanitario, en lago Agrio - Ecuador. El estudio reveló que *T. harzianum* remueve cobre en un 53,7%; plomo en 38,9% y zinc 33,5% por otro lado *P. ostreatus* puede sorber cobre en un 46,3%; plomo 43,1% y zinc 31,2% de los lodos extraídos de piscinas de lixiviación.

Villanueva (2015), evaluó el consorcio del hongo *Wallemia* sp y la microalga *Scenedesmus obliquus* provenientes del Parque Industrial Rio Seco (PIRS), en un sistema de agitación continua, los resultados indicaron una remoción del 98.72% en cuatro días de evaluación. También se realizó pruebas de resistencia de *Wallemia* sp., y *Scenedesmus obliquus* registrando 5 000 mg/l y 500 mg/l respectivamente.

Ribeiro (2009), empleó ocho especies de hongo del género *Penicillium* sp., para evaluar el potencial de biosorción selectiva de níquel, cobre, litio, cadmio, cobalto y plomo en combinaciones binarias. Los resultados alcanzados fueron interesantes ya que algunos hongos tienen mayor afinidad por uno o dos metales presentes en la mistura. Se probaron dos metodologías para la biorremediación de los metales en solución, células en crecimiento y células en reposo. El medio de cultivo utilizado en el protocolo con células en crecimiento mostró interferencias en los experimentos, por lo que el uso de células en reposo se mostró más adecuado. Los mejores resultados fueron conseguidos para la remoción de plomo, usándose células en reposo, con una remoción del 40% de plomo presente en solución en solo una hora de experimento.

Changi (2015) aisló 147 aislados fúngicos de la planta *Nepenthes ampullaria*, el 11 (7,5%) de los aislados totales fueron capaces de resistir la concentración de cobre de hasta 1 000 ppm. El aislado fúngico NA40 relacionado con *Xylaria* sp logró una biosorción de 73.26 mg/g de cobre empleando biomasa viva para luego ser estudiada en la expresión del proteoma en respuesta a la presencia de cobre. Se usaron tres concentraciones diferentes de cobre (0, 300, 500 ppm) en el estudio. Los resultados muestran que hay 11 puntos de proteína regulados por incremento y 1 punto de proteína regulado por disminución en respuesta al cobre.

Morales y Ruiz (2008) evaluaron un sistema híbrido laminar para la sorción de plomo, níquel y cadmio, conformado por los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*. Los resultados revelaron que se removi6 56%,16% y 9% de níquel, cadmio y plomo respectivamente, por otro lado, los porcentajes de remoción con biomasa libre fueron de 98%, 74% y 57% de níquel, cadmio, y plomo.

Jaramillo y Patiño (2014) emplearon sustratos residuales de la industria cafetalera (película plateada y borra de café) y fungicultora (*Pleurotus* spp), como biosorbentes de metales pesados presentes en los lixiviados del relleno sanitario “La Esmeralda” Manizales – Colombia. El tiempo de retención fue de 24 horas en reactores tipo batch, los porcentajes de remoción fueron de 75,0 y 91,7% para Cd; 91,2 y 91,2 % para Cr por último 99,9 y 99,5% para Hg, para el sustrato agotado y el testigo respectivamente.

Kapoor (1998), evaluó el potencial de la biomasa del hongo *Aspergillus niger* para remover cadmio, cobre, plomo y níquel en soluciones acuosas. Se investigaron once pretratamientos para mejorar la remoción de metales por la biomasa de *A. niger*. La capacidad de biosorción de cobre, cadmio y plomo incrementó en un 240% al ser pretratado con hidróxido de sodio, formaldehído, detergente y

dimetilsulfóxido en comparación con la biomasa viva. La biosorción de níquel fue reducida por el pretratamiento en comparación con la biomasa viva sin tratamiento. Se observó que la biosorción del níquel se redujo en un 45% cuando fue pretratada con hidróxido de sodio mientras que en cadmio, cobre y plomo pretratados con hidróxido de sodio aumento en un 240% con respecto a la biomasa viva.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Impacto de la actividad minera en el suelo.

La extracción minera provoca diferentes disturbios al ecosistema, entre los componentes el suelo resulta ser el primer afectado adoptando limitaciones físicas, químicas y biológicas para el establecimiento de vegetación (Puga et., al. 2006). Los relaves mineros son uno de los desechos en los procesos de extracción minera, generalmente presentan una mezcla de roca, tierra, agua además de altas concentraciones de insumos químicos empleados para la extracción de minerales y metales que no se lograron extraer en el proceso, ocasionando severos impactos negativos al ecosistema desde que inicia las operaciones hasta después de años del cierre de las actividades (Astete et., al. 2009; Romero et., al. 2008). La adición de minerales al suelo genera anomalías biogeoquímicas como el incremento de microelementos los cuales impactan de forma negativa el microbiota del suelo disminuyendo su diversidad y inhibiendo la descomposición normal de la materia orgánica (Puga et., al. 2006).

Los suelos que donde se desarrollan actividades de minera por lo general presentan graves problemas para el desarrollo de la vida, como microorganismos y vegetación, las características más notables serian: Textural desequilibrada, ausencia estructura edáfica, desequilibrio de propiedades químicas y contenido de nutrientes fundamentales, ciclos biogeoquímicos interrumpidos, dificultad para el enraizamiento de plantas, retención de agua mínima y aumento de compuestos tóxicos (García y Dorronsoro, 2002).

2.2.2 Los cuerpos de agua y el impacto de la actividad minera.

Los efectos producidos por el aporte de sedimentos y solidos como contribución antropogénica son: aumento de la turbidez del agua, reducción de la fotosíntesis, alteración de caudales, alteración de la vida acuática por último transformación de hábitat, debido al aumentos de más materia orgánica y productos químicos. Bivalvos, cangrejos, Camarones, gusanos, insectos entre otros, son afectados directamente acumulando los metales tóxicos en su organismo, de esta manera se inicia el proceso de biomagnificación. (Figueroa y Marino, 2001).

Los drenajes ácidos de minas (DAM), son las aguas que se escurren de las minas activas o abandonadas y suelen ser ácidas. Las DAM típicamente presentan un riesgo para el ambiente por el hecho de que a menudo contienen concentraciones elevadas de metales (hierro, aluminio, manganeso, y otros metales), sulfatos, metaloides y en algunos casos van acompañados de una gran cantidad de sólidos en suspensión (Johnson y Hallberg, 2005). Como se sabe, las concentraciones de metales en los DAM son nocivas para la vida en el hábitat, su control y tratamiento constituye un costo adicional a la operación minera. Esta problemática puede persistir durante décadas e incluso cientos de años,

constituyendo una de las principales fuentes de contaminación de las aguas superficiales y subterráneas en el mundo (Johnson y Hallberg, 2005; Aduvire, 2006). Los últimos años la puesta en operación de muchos proyectos mineros en el Perú, ha generado que las aguas contaminadas por relaves mineros se incrementen teniendo como receptores finales los ríos, lagos, lagunas y el mar (Huaranga, 2012; Pérez. 2018).

2.2.3 Metales pesados

Están considerados como metales pesados los elementos que presentan un peso específico igual a 5 g/cm^3 o mayor, incluye los metales del grupo IIA, IIIB, IVB, VB y VIB de la tabla periódica (Royal Society of Canada, 1986; akinbiyi, 2000). Los más importantes son: Plomo (Pb), Cadmio (Cd), Mercurio (Hg), Zinc (Zn), Cobalto (Co), Estaño (Sn), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Cobre (Cu) y Arsénico (As). Metales como el cobalto, zinc, molibdeno y hierro forman parte de los organismos y son indispensables en sus procesos biológicos a concentraciones bajas pero su ausencia puede causar enfermedades y su exceso intoxicaciones

2.2.4 Química del plomo (Pb)

El plomo es un elemento básico que no puede ser degradado o dissociado y en altas concentraciones toxico produciendo enfermedades (Astete, 2009). Se encuentra localizado en grupo IV de la tabla periódica y su simbolizado es "Pb", presenta una notable resistencia a la corrosión para la mayoría de ácidos como el hidroc্লórico (HCl), el sulfúrico (H_2SO_4) con excepción del ácido nítrico (HNO_3).

Su resistencia a la corrosión puede estar relacionada con su capacidad de formar una variedad de óxidos. presenta peso y numero atómico de 207.19g y 82 respectivamente, punto de fusión de 327 °C y densidad de 11.4 g/cm³ (Royal Society of Canada, 1986; akinbiyi, 2000).

2.2.5 *Impacto ecológico del plomo*

La facilidad con que se absorbe el plomo por los organismos es proporcional a su toxicidad, un factor que determina su peligrosidad, es que aun cuando se encuentre en concentraciones bajas e indetectables se pueden bioacumular en los seres vivos alterando la estructura y funcionalidad de los ecosistemas. En la actualidad se puede encontrar peces en la cuenca del Río Santa acumulando metales pesados en hígado, branquia, gónadas y músculo (Alvarez y Amancio, 2014). En las plantas pueden causar retardo en el crecimiento, inhibición de la división celular, efecto negativo en la fotosíntesis, la formación de granos y ennegrecimiento de la raíz entre otros (Aziz, 2015; Fahr, 2013). En el ser humano afecta órganos y tejidos, los niños generalmente absorben una mayor proporción plomo y con un efecto más severo en comparación a los adultos (Poma, 2008). Hasta el día de hoy y a pesar de los avances científicos las personas siguen siendo susceptibles a la exposición de los metales tóxicos, los países en vías de desarrollo son los más afectados.

2.2.6 Remoción fisicoquímica de metales.

La remediación surge por la necesidad de recuperar suelo o agua que se encuentren alterados en su composición para devolverlos a su estado inicial, estos valores pueden estar basados en estándares legislativos o consultivos con el objetivo de proteger la salud humana y la del ecosistema.

La recuperación de suelos contaminados con metales pesados depende de ciertas características del contaminante, como la afinidad con las superficies de intercambio, solubilidad, movilidad, toxicidad y estado de valencia, estas características determinan su quelación, inmovilización y/o movilización (Bosecker, 2001).

La remediación de suelos viene siendo estudiada para poder recuperar espacios perdidos, con la finalidad de volverlos a su estado inicial, las técnicas empleadas se fundamentan en los procesos fisicoquímicos naturales que son el fundamento esencial de estos procesos (Evans, 1989). En la recuperación de suelos contaminados por metales pesados encontramos algunas técnicas que emplean moléculas de hidróxidos e iones cloruro, considerados como ligandos inorgánicos de gran importancia debido a sus propiedades físico químicas para unirse metales (Sposito, 1989). Sulfatos, carbamatos y fosfatos, así como los hidróxidos y cloruros se pueden unir a los metales para su recuperación, generalmente son empleados en técnicas de precipitación, las soluciones son influenciadas por el pH, el potencial redox del suelo y la solubilidad (K_{ps}) de los componentes (Rieuwerts et al., 1998; Basta 2004).

Las soluciones de suelo contaminados se pueden absorber neutralizando las cargas negativas de los coloides por una cantidad equivalente de cationes para luego ser adsorbidas electrostáticamente por superficies cargadas formando complejos llamados de esfera externa. La desventaja de estos métodos por lo general es, que requieren excavaciones en el suelo lo que puede significar un costo ambiental y económico (Alloway, 1995; Jara, 2018).

Por otro lado, en la recuperación de agua contaminada por metales se emplean diferentes métodos como los siguientes: la filtración por membrana que presenta alta eficiencia, requiere poco espacio y de fácil operación, además, genera una gran cantidad de lodos que contienen metales, se emplea en procesos para el tratamiento de agua potable, aguas residuales industriales y en menor medida aguas residuales domésticas. La electrodiálisis es una técnica de descontaminación que puede remover componentes iónicos de soluciones acuosas empleando membranas permeables selectivas en un campo eléctrico constante, tiene la capacidad de remover iones contaminantes cargados de hasta $0,0001 \mu\text{m}$ (Taylor y Wiesner, 2002; Costa, 2004.). La osmosis inversa es un proceso de permeación a través de membrana para la separación por difusión controlada o cribado tiene la capacidad de separar elementos de 0.0001 mm . En la actualidad se han descubierto nuevas técnicas como la nanofiltración la cual emplea poros menores de 1 nm junto ha presiones de funcionamiento de rango de $10\text{-}50 \text{ bar}$ consiguen la filtración de metales. Un proceso que tiene selectividad, genera bajo volumen de lodos y recuperación del metal, es la técnica del intercambio iónico, la cual recupera metales disueltos en una solución transfiriéndolos a una matriz sólida, esta a su vez libera iones de tipo diferentes, pero en la misma carga (Nemerow y Dasgupta, 1998; González, et al., 2006; Zewail y Yousef, 2015). La adsorción es la técnica que presenta remoción de una amplia variedad de contaminantes, alta capacidad, cinética rápida y posiblemente selectiva dependiendo de adsorbente de lo cual también depende su rendimiento plantas o desechos lignocelulósicos, carbón activado, zeolitas,

arcillas, biopolímeros y perlas de sílice son comúnmente empleados para remover colorantes iónicos, metales pesados, materiales radioactivos entre otros. La precipitación química es una técnica muy empleada en los procesos industriales ya que es relativamente sencilla de operar, económica y selectiva, pero de mantenimiento costoso por la generación de lodos (Wan Ngah et al., 2011; Karnib, et al., 2014; Chen et al., 2009). El empleo de cargas eléctricas es una opción para recuperar soluciones contaminadas con metales, en donde se emplea un reactor electrolítico, es un recipiente que presenta una fuente de corriente con varios electrodos de hierro y aluminio encargados de aportar iones recuperando los metales de la suspensión coloidal, estos electrodos reemplazan a las sustancias químicas empleadas en el tratamiento convencional, esta técnica tiene como base los principios de coagulación y floculación. Por último, la técnica de flotación se basa en disolver agentes tenso activos de superficie en aguas residuales hidrófobas, los metales y agentes tenso activos unidos consiguen la flotación con los metales, posteriormente se eliminan los agentes tensoactivos mediante burbujas de aire (Morante, 2002).

2.2.7 Remoción biológica de metales.

Los métodos biológicos también llamados métodos de biorremediación aprovechan el metabolismo celular de los organismos vivos como bacterias hongos y plantas en la remoción de ambientes contaminados. Los procesos más conocidos que dan compuestos insolubles en agua o compuestos volátiles son la precipitación, sorción, volatilización y la lixiviación de metales pesados (Marrero et al., 2010). La biorremediación se presenta como una alternativa altamente recomendable debido a su bajo impacto al medio ambiente y producción mínima de residuos (Gadd, 2010). La biodisponibilidad de los metales pesados es alterada debido al cambio en su estado de valencia provocada por lo

hongos y bacterias para su confinamiento, inhibir su movilidad, toxicidad y modificar su solubilidad (Bosecker, 2001; Stephen y Macnaughton, 1999).

Los procesos de la biosorción y la bioacumulación en las bacterias y hongos se producen porque las cargas negativas presentes en los grupos aminos, carboxilos y fosforilos localizadas en el material extracelular, membranas, paredes celulares atraen a las cargas positivas de los metales mediante uniones electrostáticas, unión covalente, fuerzas de Vander Wals, redox y precipitación celular, también se puede dar la unión conjunta de estos tipos de atracción (Gadd, 2004; Kirchman, 2012). Cuando el metal pesado pasa por la superficie celular e ingresa a la célula los cationes metálicos en algunos casos son precipitados o ligados a interior de una vacuola entre otras estructuras para neutralizar su toxicidad.

En la bioacumulación se produce gasto de energía celular cuando el metal pesado ingresa al entorno intracelular por el sistema de transporte de membrana este gasto de energía lo realiza la bomba de H/ATPasa, cuando el metal se encuentra en el citoplasma este es ligado por proteínas citoplasmáticas ricas en grupos sulfhidrilos denominadas fitoquelatinas (FQ), metalotioneínas (MT) entre otros péptidos de unión a metales, para el caso de los hongos, los metales pesados son encapsulados al interior de vacuolas (Marrero et al, 2010).

La biotransformación de un metal del estado insoluble inicial que corresponde a una fase sólida a un estado soluble final que corresponde a una fase acuosa, se le define como lixiviación y depende del estado de oxidación del metal como del microorganismo. En el proceso de biolixiviación se describen dos formas la primera de tipo heterotrófica que consiste en la acidificación del medio por la célula liberando protones por la membrana plasmática esto genera una competencia entre metales y protones para formar un complejo metal anión o

cuando el metal esta asimilado con alguno otro elemento generando por competencia la liberación del catión metálico (Gadd, 2004) y la segunda de tipo autotrófica que es producida por bacterias acidófilas y quimiolitotróficas, estos microorganismos fijan dióxido de carbono y obteniendo energía de la oxidación de compuestos sulfúricos y férricos reducidos, generando ácido sulfúrico (H_2SO_4) y hierro (Fe III) consiguiendo la lixiviación de hierro (Rawlings y Silver, 1995; Schippers y Sand, 1999). La generación de sulfúrico (H_2SO_4) y hierro (Fe III) en el medio extracelular también propicia la solubilización de otros compuestos metálicos, los microorganismos más conocidos en el proceso de biolixiviación autotrófica son las que oxidan hierro y azufre *Thiobacillus thiooxidans*, *T. ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* (Donati y Sand, 2007).

Las reacciones redox que realizan se agrupan en dos formas las asimilatorias y las desasimilatorias, la primera se produce cuando el metal se encuentra participando en el metabolismo del organismo como aceptor final de electrones y la segunda la función de metal es desconocida en el proceso metabólico del organismo e indirectamente inicia las reacciones redox, algunas bacterias pueden usar reacciones desasimilatorias para juntar la reducción de Fe (III) con la oxidación hidrogeno o compuestos aromáticos, alcoholes de ácidos orgánicos simples, en este caso varias bacterias juntan la oxidación de ácidos orgánicos simples, alcoholes, hidrógeno o compuestos aromáticos con la reducción de Fe (III) o Mn (IV). (Bolan, et al., 2014). Algunas bacterias pueden reducir el cromo VI un toxico y mutagénico a su forma cromo III menos toxica y soluble, como también se puede producir por procesos bióticos y abióticos la oxidación de Cr III a Cr VI incrementando su movilidad y disponibilidad (Choppala et al, 2013; Garbisu et al, 2003).

La biovolatilización se produce en algunas bacterias y hongos mediante el proceso de metilación modifican la solubilidad, toxicidad y volatilidad de metaloides y metales pesados como el Hg, As y Se con respecto a su composición inicial (Tabak et al., 2005). La metilación puede intervenir reduciendo metil mercurio forma toxica a una forma menos tóxica y más volátil como el Hg^0 por la acción de la enzima mercurio reductasa (Valls y De Lorenzo, 2002). Bacterias como *Deinococcus radiodurans*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*, del mismo modo se han reportado géneros fúngicos como, *Penicillium*, *Ulocladium* *Alternaria*, *Fusarium*, *Acremonion*, y *Scopulariopsis* que pueden volatilizar Se, con una primera reducción de Se a Se^2 seguido de una metilación (Cursino et al., 2000; Okino, et al., 2000; Frankenberger y Karlson, 1995).

El objetivo de la biorremediación empleando microorganismos para recuperar sedimentos y suelos contaminados con metales pesados es inmovilizarlos in situ reduciendo su biodisponibilidad o removerlos del suelo (Rajendran et al, 2003). Existe un procedimiento in situ que emplea microorganismos que remueven y extraen metales in situ, es empleada para tratar suelos contaminados por Hg II toxico, el cual mediante un proceso microbiano pasa a Hg^0 el cual es volátil (Hobman y Brown,1997), pero este proceso solo se puede emplear en algunos metales como el Hg, la mayoría de los metales no tienen forma volátil (Lovley y Lloyd, 2000).

Los microorganismos pueden excretar moléculas ligadoras de metales que pueden ser ácidos fúlvicos, húmicos, orgánicos, alcoholes y grandes polisacáridos, estas moléculas pueden precipitar metales en la pared celular de los microorganismos o fuera de ella. En la pared celular de bacterias gran positivas los grupos péptidoglicano son los principales lugares de unión de cationes o metales pesados, mismo modo en la pared celular de las bacterias gran negativas el grupo fosfato se une a los cationes metálicos. Este tipo de precipitación de

cationes metálicos a nivel extracelular producida por microorganismos, es un mecanismo exitoso que mantiene fuera los iones tóxicos (Wu et al, 2010). La bioprecipitación mediante la reducción biológica hace que la los metales con forma oxidada pasen a su forma reducida precipitando fácilmente en una solución acuosa, la reducción biológica disminuye la biodisponibilidad de ciertos cationes metálicos volviéndolos menos tóxicos (Valls & De Lorenzo, 2002).

Las bacterias sulfatos reductoras (BSR) tienen la propiedad de oxidar compuestos orgánicos simples al emplear el sulfato como aceptor de electrones generando sulfuro (S^{2-}) elevando el pH durante el proceso, el sulfuro reacciona con los metales disueltos formando metal sulfuro, los cuales presentan una toxicidad muy baja (Jong y Parry, 2003), esta cualidad es comúnmente aprovechada en los tratamientos de suelos y aguas contaminadas con metales pesados. (White et al., 1998)

Microrganismo como *Alcaligenes eutrophus* y *Pseudomonas aeruginosa* presentan la capacidad de producir sideróforos, moléculas acomplejantes de hierro. Los sideróforos son moléculas que presentan alta afinidad a los metales pesados característica que puede ser aprovechada en procesos de biorremediación (Gilis et al, 1996). Otras moléculas que se van reportando son los biosurfactantes y los ramnolipidos las cuales están siendo utilizados para la remoción de suelos contaminados con Cd y Pb presentado un gran potencial (Juwarkar et al, 2007; Rajendran et al, 2003).

Las plantas fitoextractoras como métodos biológicos son especies que tienen gran capacidad de acumular (hiperacumuladoras) metales pesados en sus partes vegetativas, una vez realizado el proceso de acumulación de los metales pesados en las plantas se procede a eliminarlos desde la raíz, de esta forma se emplean las plantas fitoextractoras. Las metafitas son especies vegetales que

han desarrollado mecanismos fisiológicos para resistir, tolerar y sobrevivir en suelos contaminados con metales pesados. Estudios genéticos de especies vegetales con estas características demostraron que ha tomado cientos, miles o millones de años en desarrollar mecanismos de supervivencia a condiciones tóxicas (Delgadillo et al., 2011).

La especie *Thlaspi caerulescens* es una especie hiperaumuladora de Zn, esta especie se considera como modelo en los estudios de tolerancia a metales de fitoextracción (Becerril, et al., 1988). El grado de resistencia o tolerancia a la toxicidad de metales pesados difiere con las especies, tanto desde el punto de vista de los mecanismos como de amplitud y distribución en las distintas especies incluso en variedades o ecotipos de una misma especie. La tolerancia parece depender de varios genes con carácter aditivo y dominante, aunque se han visto casos de tolerancia ligada a un único gen, sin embargo, en algunos casos se ha comprobado que las plantas pueden presentar tolerancia múltiple (Blum, 1988).

Los hongos pueden ayudar a la extracción de metales pesados formando micorriza arbuscular (HMA) (Khan, 2006). Se han reportado especies de HMA con estas cualidades con diferencias en su sensibilidad a metales pesados, pueden disminuir la toxicidad del metal para la planta hospedera atrayendo iones a su pared celular o envolviéndolos con polisacáridos estas asociaciones tienen gran potencial biorremediador por lo que está cobrando interés entre los investigadores (Khade y Adholeya, 2007; Rajendran et al., 2003).

2.2.8 Interacción hongo y metales pesados

Los hongos presentan una variedad de ventajas para su estudio en técnicas de biorremediación, los encontramos en hábitats terrestres y sedimentos acuáticos, su micelio puede atravesar el suelo contaminado y generar metabolitos como enzimas extracelulares, intracelulares y de pared celular que pueden degradar o transformar los contaminantes (Rodríguez, 2005).

Los hongos que sobreviven en ambientes de alta concentración de metales pesados como en las áreas de extracción minera, adquieren la propiedad de tolerar diferentes metales pesados en concentraciones más altas de lo normal, (ver figura 2 y figura 3), debido a la disminución y eliminación de microorganismos que no logran resistir las concentraciones elevadas de metales pesados, la pared celular de estos hongos tienden adoptar capacidades de unión a metales, como también pueden mostrar valores altos de bioacumulación (De Rome y Gadd 1987; Cerino et al. 2011).

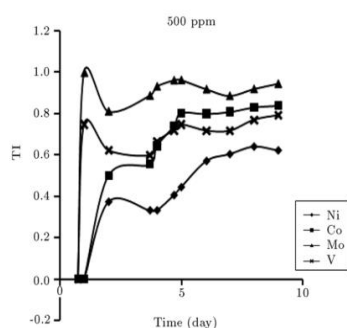


Figura 2 Tolerancia de *Aspergillus niger* en 500 ppm de Ni, Co, Mo y V
Fuente. Datos tomados de Anahid et al., (2011).

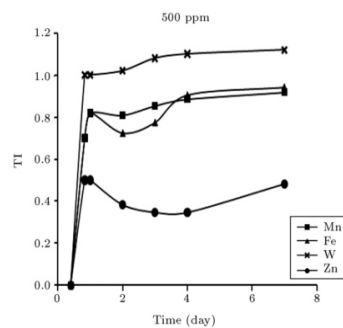


Figura 3: Tolerancia de *Aspergillus foetidus* en 500 ppm de Mn, Fe, W y Zn.
Fuente. Datos tomados de Anahid et al., (2011).

Dentro de los hongos que sobreviven en ambientes contaminados con metales pesados se presenta dos tipos, los hongos resistentes también llamados tolerantes, que se caracterizan por presentar mecanismos de detoxificación estimulados por la exposición al metal y los indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Ambos tipos de microorganismos resistentes e indiferentes son de interés por su propiedad de extraer metales.

Existen dos mecanismos que se han propuesto dentro de los hongos tolerantes a metales: el secuestro extracelular (quelación y unión a la pared celular) y el secuestro físico intracelular mediante la unión a ligandos y/o proteínas entre otros, estos mecanismos tienen la finalidad de evitar que el metal dañe las células (Anahid et al., 2011).

2.2.9 Quelación extracelular

Los mecanismos extracelulares están implicados principalmente en evitar la entrada del metal al citosol, mediante segregación de ligandos de bajo peso molecular que inmoviliza al ion metálico transformándolo en una molécula químicamente estable, los hongos que generan la pudrición café y blanca de la madera presentan la capacidad de segregar sideróforos o quelantes los cuales reaccionan formando complejos metálicos, las moléculas más conocidas son: catecol y el ácido oxálico (Reyes, 2007). Pócsi, (2011) encontró que los hongos *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum* pueden producir material extracelular mucilaginoso (MECM o emulsionante) con muy buena capacidad de unión a metales como el Ni (II), Cu (II) u otros, estimulando la saturación de los ácidos grasos celulares y procesos de peroxidación lipídica. *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* y *T. versicolor*, son hongos que generan la pudrición blanca los que producen altas cantidades de oxalato (Morales y Ruiz, 2008).

La inmovilización de iones metálicos durante la degradación de la lignina se da por la producción de policarboxílicos, ácido cítrico, oxálico y orgánicos, solubilizando iones metálicos y formando compuestos de oxalato y otras moléculas insolubles en forma de cristales aumentando la tolerancia por la reducción de su biodisponibilidad (Reyes, 2007). En el proceso de degradación de la lignina los metales Cu (II) y Cd (II) pueden ser intercambiados por iones metálicos de calcio formando compuestos solubles (Malagre et al., 2002).

La Lacasa, Manganese peroxidasa y Lignina peroxidasa comprenden el sistema enzimático de los hongos de la podredumbre blanca (Pointing, 2001), enzimas ampliamente estudiadas, pero han pasado desapercibidas en cuanto a la interacción que tienen con los metales pesados durante el proceso de degradación de la lignina. Baldrian, (2005), encontró que los sistemas de expresión de las enzimas lignolíticas de *P. ostreatus* son resistentes a altas concentraciones de Pb, Zn, Cu, Cd y Mn, pero con la elevación en la actividad de lacasas e hidrogeno peroxidasas en presencia de Pb. También observo el efecto negativo del Pb, Mn, Cu, en la actividad del enzima manganese peroxidasa. Metales como el Zn, Cu y Pb son conocidos como aceleradores en la producción de especies de oxígeno tóxicas, como radicales superóxidos sintetizados en su mayoría por las hidroperoxidasas.

2.2.10 Bioadsorción fúngica

Es una propiedad que presentan los hongos para capturar metales y puede estudiarse mediante modelos fisicoquímicos, los más conocidos son las isotermas de Langmuir y Freundlich y por lo general la biosorción es de cinética rápida y no depende de la temperatura (Arreita, 2019).

Las paredes de células fúngicas son estructuras macromoleculares complejas compuestas principalmente de quitinas, glucanos, mananos y proteínas, también contienen otros polisacáridos como lípidos y pigmentos las cuales se pueden cargar negativamente (ver figura 4).

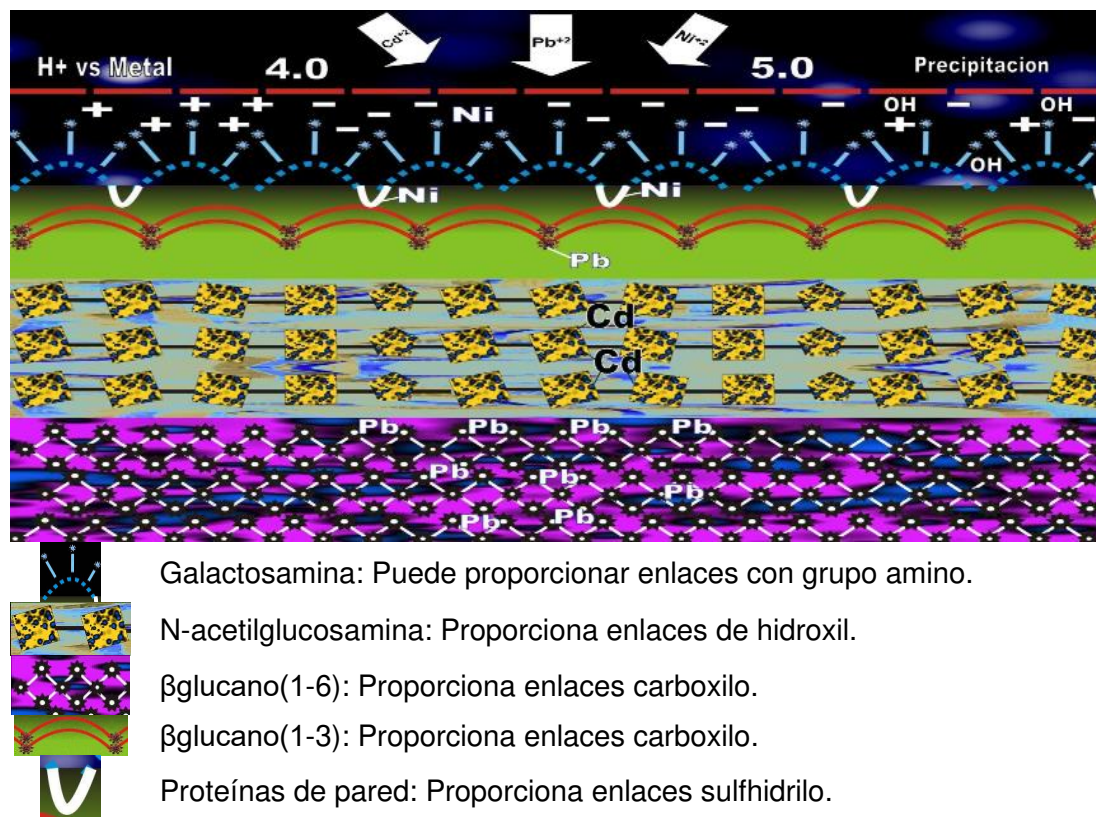


Figura 4 Sorción de metales en las estructuras de la pared celular del hongo.
Fuente. Datos tomados de Moralez y Ruiz (2008).

La sorción en la superficie celular permite la interacción entre iones metálicos (cationes) tóxicos y grupos funcionales tales como: grupos amino, sulfato, hidroxilo, carboxilato y fosfato, estas interacciones ocurren a través del intercambio iónico, la complejación y la adsorción física, esta interacción se produce con la formación de un enlace covalente coordinado y el ion metálico actúa como un átomo central que dispone de orbitales vacíos con la capacidad de aceptar pares de electrones, estos pares de electrones son precisamente donados por los grupos funcionales nombrados (Navarro et al., 2006; Gadd y Griffiths, 1980).

La envoltura hifal extracelular de los hongos está principalmente compuesta por polisacáridos (β 1-3 y β 1-6 glucano) y tiene la propiedad de atrapar iones metálicos mostrando una primera barrera para el metal (Baldrian, 2005). La interacción fisicoquímica se da en forma de una reacción en equilibrio por intercambio iónico y los reactivos se encuentran en cantidades químicamente equivalentes y se desarrolla hasta agotar la capacidad estequiométrica (Castro, 1998). Producto de la captación de iones metálicos por la pared celular se liberan cationes como Na^{+2} , H^{+1} , Ca^{+2} , K^{+1} y Mg^{+2} hasta alcanzar el equilibrio (Iqbal et al., 2007).

2.2.11 Bioabsorción fúngica

Los micronutrientes esenciales como el Zn, Mn, Fe, aniones como fosfatos, sulfatos glucosa y glicerol ingresan a la célula por canales transportadores como la bomba de H^{+} (ATPasas), mediante estos canales tienden a ingresar los metales esenciales y los no esenciales al medio intracelular generándose la bioacumulación (Morales y Ruiz, 2008).

La célula al detectar exceso de microelementos activa un mecanismo intracelular que tiene como objetivo reducir la carga del metal en el citosol, para este fin las proteínas transportadoras de metales como las metalotioninas, proteínas que presentan una función en el almacenamiento, regulación intracelular y desintoxicación participan en la extrusión iones metálicos del citosol fuera de la célula o atrapando el metal en compartimentos vacuolares (Bellion, et al., 2006; Abdul et al., 2007; Baldrian, 2005). Si anuláramos el canal o el transportador responsable del ingreso de los metales y metaloides tóxicos, no sería suficiente para mantenerlos fuera del citoplasma, pues pueden ingresar a través de diferentes transportadores, si anuláramos un canal de transporte estaríamos alertando el normal metabolismo del celular lo cual sería contraproducente para la célula (Arrieta, 2019).

3 METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de investigación

El presente trabajo es de tipo aplicativo por emplear información descrita por otros autores anteriores a este trabajo, experimental pues se empleó procedimientos para el aislamiento y evaluación de los hongos ajustando variables para obtener las condiciones de crecimiento in vitro, prospectivo por que obtuvimos los datos a partir de los procedimientos empleados, longitudinal porque la variable crecimiento del hongo fue medido repetidamente y analítico por presentar más de dos variables: crecimiento, concentración de plomo y biosorción .

3.2 Unidad de análisis

La biosorción y crecimiento de los hongos filamentosos cuando son expuestos a concentraciones de plomo.

3.3 Población de estudio

Los hongos filamentosos presentes en el relave Carhuacayán en el distrito Santa Bárbara de Carhuacayán Yauli – Junín después de 30 de abandono.

3.4 Tamaño de muestra

Se determinó el tamaño de muestra mediante criterios ecológicos identificando tres áreas representativas del relave Carhuacayán para lo cual previamente se realizó un recorrido determinado los puntos de muestreo.

3.5 Selección de muestra

En las tres áreas representativas se colocó una cuadrícula en cada una y se tomó cinco muestras de manera aleatoria. Este método consiste en contar los individuos de una cuadrícula y extrapolar los resultados para el área total.

3.6 Técnicas de recolección de datos.

3.6.1 Área de muestreo

El relave minero Carhuacayán se encuentra ubicado en el distrito de Santa Bárbara de Carhuacayán, este relave se generó por la explotación de la mina del mismo nombre desde 1964 hasta 1983 la cual presenta vetas de sulfuros de Pb, Cu, Zn y Ag (ver cuadro 1).

Cuadro 1. Información geo-referencial en coordenadas UTM de las estaciones de muestreo del relave Carhuacayán.

COORDENADAS E/N	ALTURA (msnm)	ESTACIÓN DE MUESTREO	CUADRANTE	CUADRICULA (C)	TIPO MUESTRA
356581.8 /8761996.6	4203	CRH 1	3	1	RELAVE
		CRH 2	4		
		CRH 3	9		
		CRH 4	16		
		CRH 5	20		
356642.7 /8762052.8	4198	CRH 6	3	2	RELAVE
		CRH 7	12		
		CRH 8	13		
		CRH 9	15		
		CRH 10	24		
356685.9 /8762208.9	4205	CRH 11	2	3	RELAVE
		CRH 12	3		
		CRH 13	5		
		CRH 14	6		
		CRH 15	17		

Fuente. Elaborado por el autor.

3.6.2 Muestreo

Los puntos de muestreo fueron determinados por criterio de experto, realizando un recorrido por todo el relave Carhuacayán e identificando las áreas representativas del pasivo ambiental (ver figuras 5,6,7,8), se determinaron tres áreas representativas en las cuales se procedieron a tomar muestras.



Figura 5 Área de color parda dentro del relave Carhuacayán. *Fuente.* Imagen tomada por el autor.



Figura 6 Relave Carhuacayán predomina el color gris en toda el área. *Fuente.* Imagen tomada por el autor.



Figura 7 Excremento de ganado ovino de la zona en el relave Carhuacayán. *Fuente.* Imagen tomada por el autor.



Figura 8 Desmoronamiento y escurrimiento del relave Carhuacayán y flora limitada a los contornos del relave. *Fuente.* Imagen tomada por el autor.

3.6.3 Muestreo superficial

Se tomaron las ubicaciones georreferenciales en las tres zonas seleccionadas en cada área se colocó una cuadrícula que estuvo compuesta por 25 cuadrados de 1 m^2 , de los cuales se eligieron aleatoriamente 5 cuadrados de donde se tomaron las muestras de relave. Este procedimiento se repitió en las tres cuadrículas colocadas de las áreas seleccionadas, teniendo un total de 15 cuadrados de 1 m^2 para la tomar muestra.

Para la toma de muestra, se limpió cuidadosamente el área de a muestrear (1 m^2) de cualquier desecho o escombros superficial, con una picota se removi6 el relave a una profundidad de 10 centímetros (ver cuadro 2), luego se tomaron las muestras de un kilogramo en bolsas ziploc (ver figura 9 y 10), codificadas las 15 muestras fueron almacenadas en un cooler y trasladadas al laboratorio para su procesamiento (Adaptado MINAM, 2014).



Figura 9 Medición de profundidad, 10 cm. Fuente. Imagen tomada por el autor.

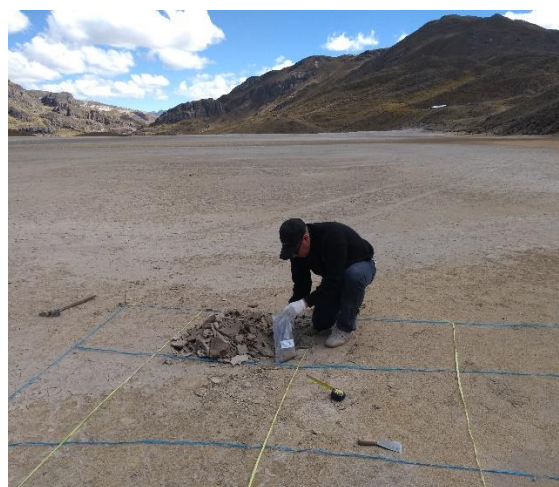


Figura 10 Toma de muestra en bolsas ziploc. Fuente. Imagen tomada por el autor.

Cuadro 2. Profundidad de muestreo según el uso del suelo.

USO DEL SUELO	PROFUNDIDAD DEL MUESTREO (CAPAS)
Suelo Agrícola	0 – 30 cm (1)
	30 – 60
Suelo Residencial / Parques	0-10 cm (2)
	10 30 cm (3)
Suelo Comercial/ Industrial/ Extractivo	0 – 10 cm (2)

1) Profundidad de aradura.
 2) Capa de contacto oral o dermal de contaminantes.
 3) Profundidad máxima alcanzable por niños.

Fuente. MINAM (2014).

3.6.4 Aislamiento de hongos filamentosos.

Los hongos fueron aislados los mediante el método de diluciones seriadas modificada (Davet y Rouxel, 2000), método útil para los estudios iniciales de la ecología de comunidades fúngicas en el suelo. 10 gramos de relave se disolvieron en 90 ml de agua destilada estéril en un matraz de 250 ml, fueron agitados durante 30min a 160 rpm en un agitador magnético, luego de diluyó de 10^{-1} hasta 10^{-4} , se sembraron en proporción 1:10 en 50 ml de caldo Yeast Peptone Glucose (YPG), se agitaron a 120 rpm/48 horas y se mantuvo en reposo por 6 días a temperatura de laboratorio, se cogió los pellets formados por los hongos y se sembró en agar YPG, luego se repicaron en Agar papa Dextrosa (APD) y se conservaron en viales (ver Figura 11 y12).



Figura 11 Aislamiento por diluciones seriadas. Fuente. Imagen tomada por el autor.



Figura 12 Hongos aislados del relave minero. Fuente. Imagen tomada por el autor.

3.6.5 Evaluación del crecimiento fúngico expuesto a plomo (Pb)

La influencia del plomo en el crecimiento de la población de hongos de la relavera Carhuacayan se determinó en medio agar czapeck-Pb a tres concentraciones (1.25, 1.75, 2.25 g/l). Fueron sembrados por puntura e incubados por 7 días a temperatura ambiente para luego medir el diámetro del crecimiento radial fúngico en milímetros (ver figura 13).



Figura 13 Crecimiento fúngico en, **A: Agar Papa Dextrosa; B: Czapeck-plomo (1.25g/l); C: Czapeck- plomo (1.75 g/l) y Czapeck- plomo (2.25 g/l).**
Fuente. Imagen tomada por el autor.

Los resultados fueron procesados por el programa Microsoft Excel en donde se realizó el análisis de varianza ANOVA y TUKEY para poder determinar las diferencias significativas de crecimiento entre las concentraciones evaluadas (Adaptado de Cárdenas et. al., 2010; Rodríguez y Pereira, 2007).

3.6.6 Identificación de los hongos.

Se identificaron los diez hongos que pasaron a evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), mediante la técnica de micro-cultivo (ver figura 14) y fueron identificadas por las características macroscópicas y microscópicas de sus estructuras reproductivas con la ayuda de claves taxonómicas de identificación del libro de Barnett y Hunter, 1999.

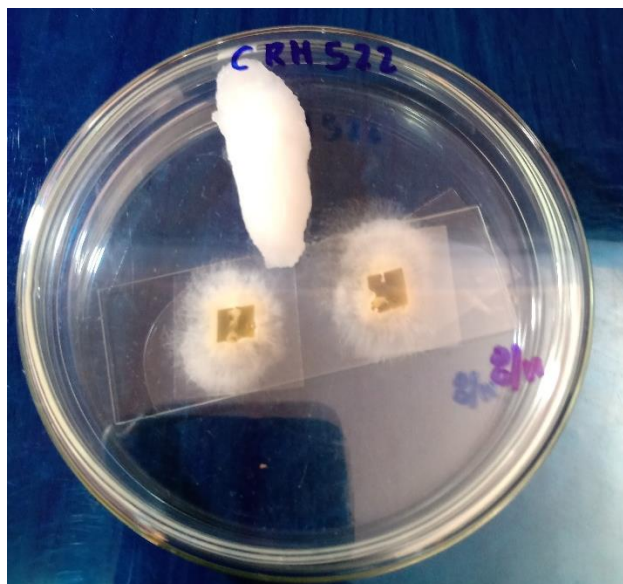


Figura 14 Técnica del micro cultivo, incubación al 5to día en cámara húmeda CRH 522 género *Paecilomyces*. Fuente. Imagen tomada por el autor.

3.6.7 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinó la CMI de diez cepas fúngicas mediante la técnica de resistencia en placa en agar Czapek - nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), a concentraciones de 0, 1.25, 1.75, 2.25, 2.75, 3.25 y 3.75 g/l de plomo, sembramos e incubamos por 7 días a temperatura ambiente (ver figura 15), medimos diámetro del crecimiento radial fúngico en milímetros (Adaptado de Cárdenas, 2010; Rodríguez y Pereira, 2007).

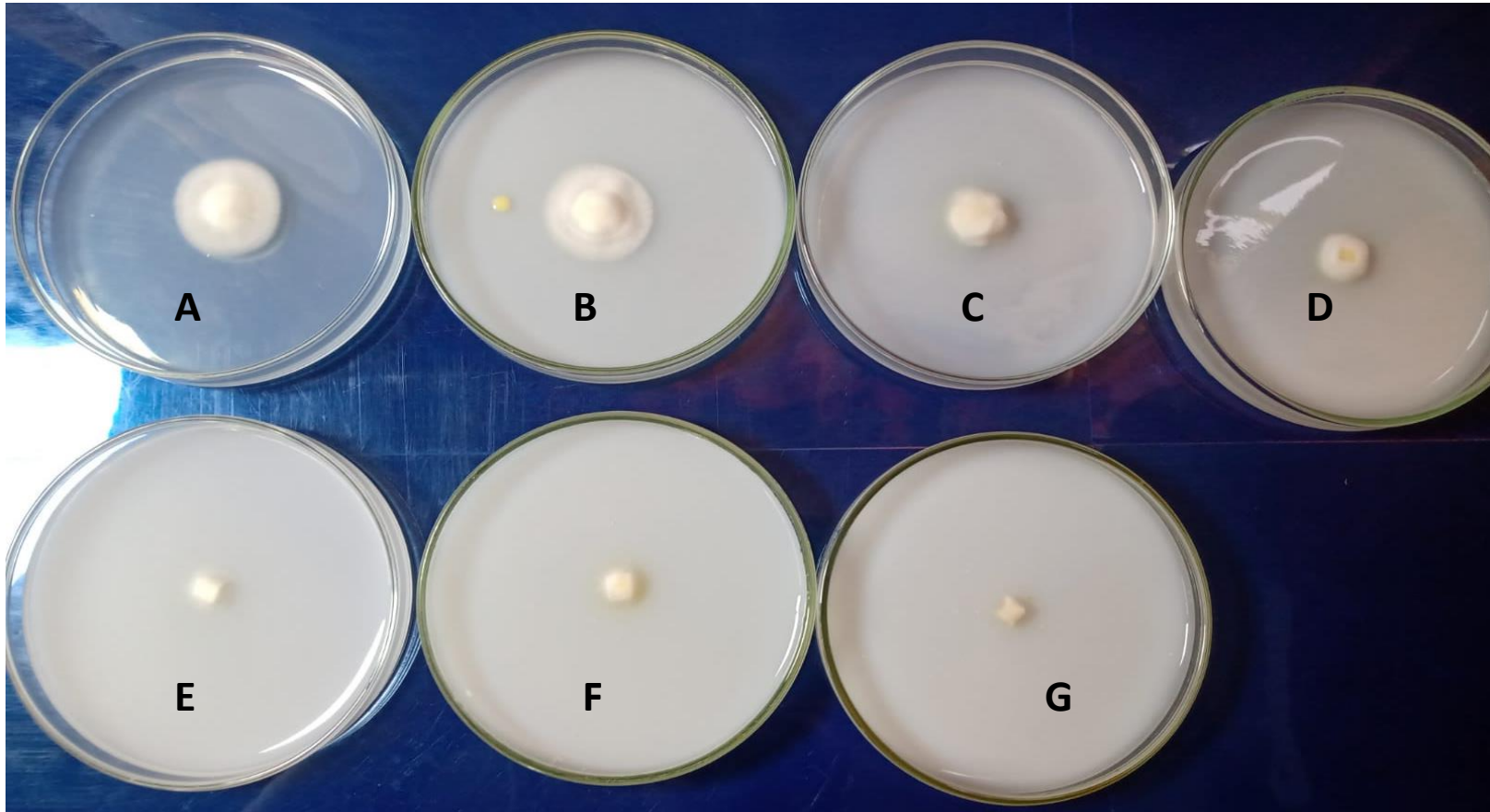


Figura 15 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) 1405 género *Epidermophyton* A: 0; B: 1.25; C: 1.75; D: 2.25; E: 2.75 F: 3.25 G: 3.75 g/l de plomo (Pb). Fuente. Imagen tomada por el autor.

3.6.8 Evaluación de la biosorción de plomo por biomasa viva.

La evaluación de la biosorción de plomo por biomasa fúngica viva de tres cepas se realizó en medio de cultivo líquido Czapeck – Dox con agregado de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). Para la evaluación se preparó una solución con agua ultra pura de nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) a una concentración de 1 ppm, a esta solución se le agregó las sales del medio de cultivo Czapeck-Dox y se ajustó a pH 5.5. Se dispensaron en 15 matraces 50 ml de la solución para luego ser esterilizado por calor húmedo, se le agregó por triplicado césped de micelio de los tres hongos más un control negativo y un blanco, todo por triplicado y se colocaron en un agitador orbital a 100 RPM por 6 días (ver figura 16). Se tomó muestras el día 0, 2, 4 y 6 y fueron analizadas por ICP MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente) para determinar la concentración de plomo. El programa Microsoft Excel fue empleado para analizar los resultados obtenidos determinando el porcentaje de remoción de plomo II mediante la fórmula: $(\text{CI} - \text{CF}/\text{CI}) \cdot 100$.

CI : Concentración de metal inicial.

CF : Concentración de metal final.



Figura 16 Crecimiento al sexto día de la cepa CRH 522 género *Paecilomyces* sembrado por triplicado en caldo de cultivo Czapeck – plomo (1ppm) para la evaluación de biosorción de plomo. *Fuente.* Imagen tomada por el autor.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis, interpretación y discusión de resultados.

Aislamiento de hongos tolerantes a metales pesados

El relave Carhuacayán es de superficie arenosa compacta en mayor parte presenta color gris, áreas color naranja claro y color pardo de superficie costrosa, estas coloraciones se pueden observar en el centro del relave y en los bordes de relave, también se puede observar el desmoronamiento y escurrimiento que ha sufrido el relave debido al tiempo y las lluvias de la zona. La flora se encuentra limitada a los extremos del relave, lo que sí se puede observar al interior del relave es el excremento dejado por animales de pastoreo de la zona, indicando que transitan por el pasivo ambiental. En las tres áreas representativas del relave se colocó una cuadrícula: cuadrícula 1 (C1) presentaba color naranja, Cuadrícula 2 (C2) de color pardo de superficie costrosa y la cuadrícula 3 (C3) de color gris (ver figura 17, 18 y 19).

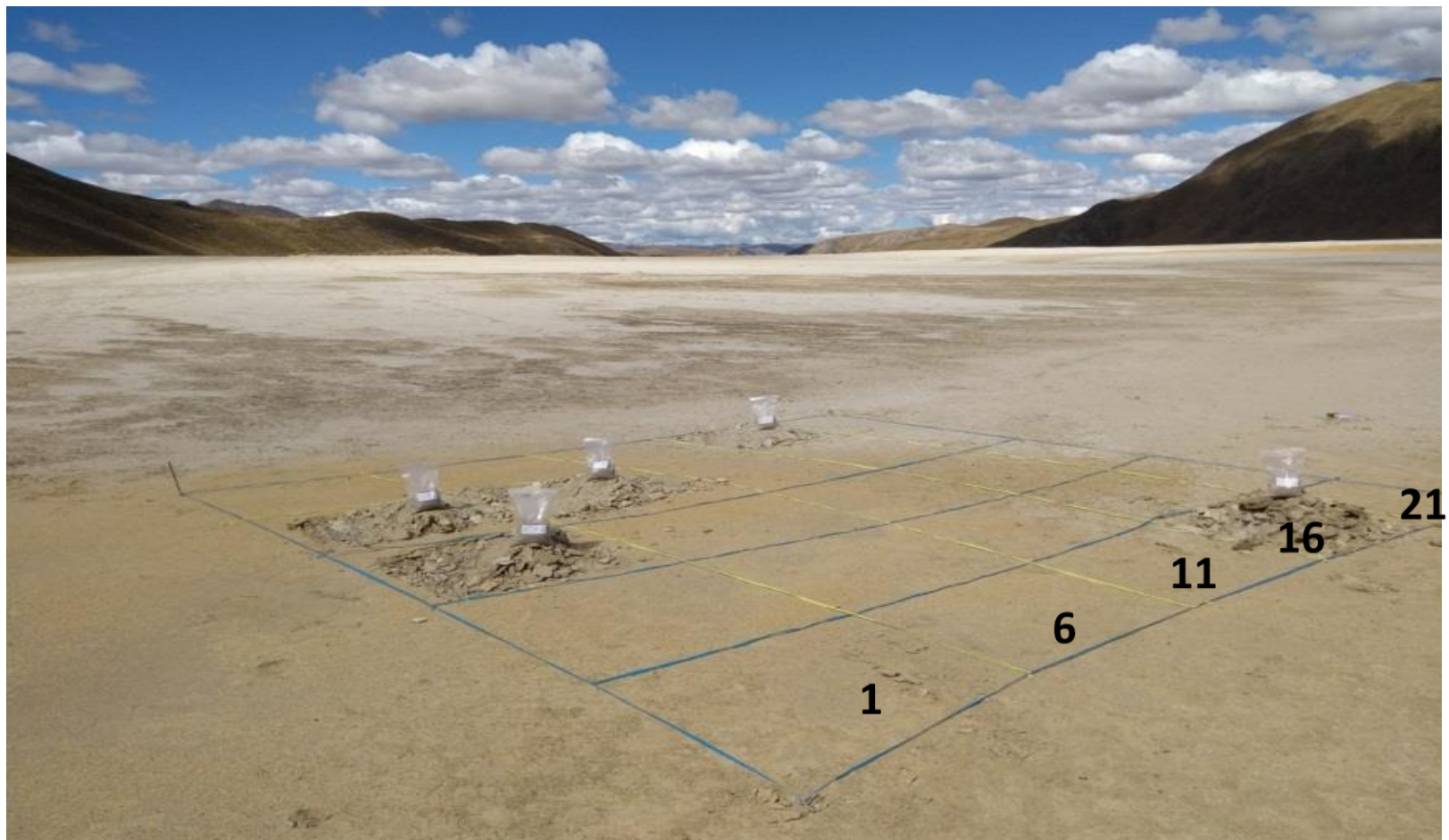


Figura 17 Cuadrícula 1 (C1) y muestras en los cuadrantes 3, 4, 9, 16 y 20. Fuente. Fuente. Imagen tomada por el autor.

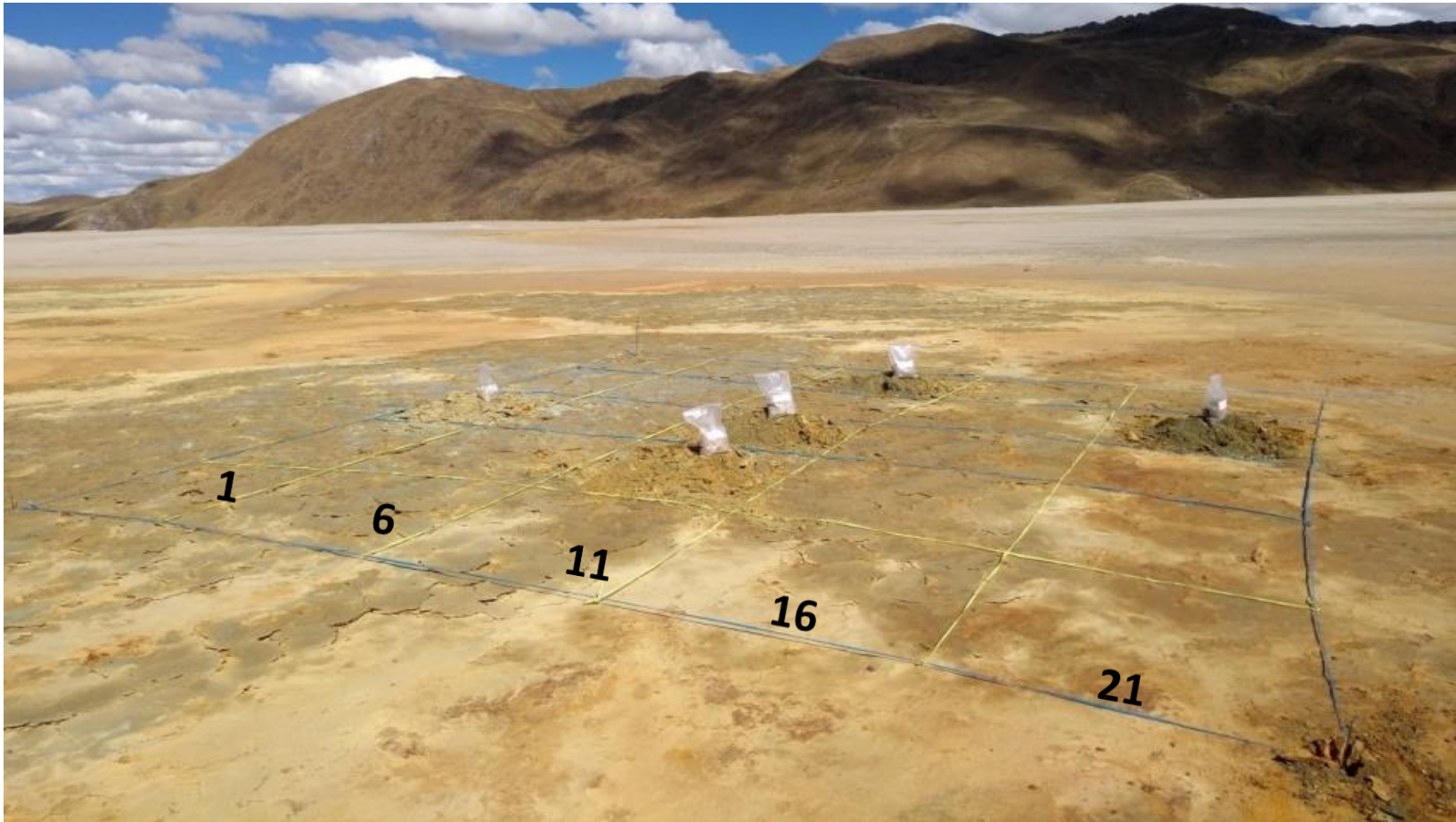


Figura 18 Cuadrícula 2 (C2) y muestras en los cuadrantes 3, 12, 13, 15 y 24. Fuente. Imagen tomada por el autor.

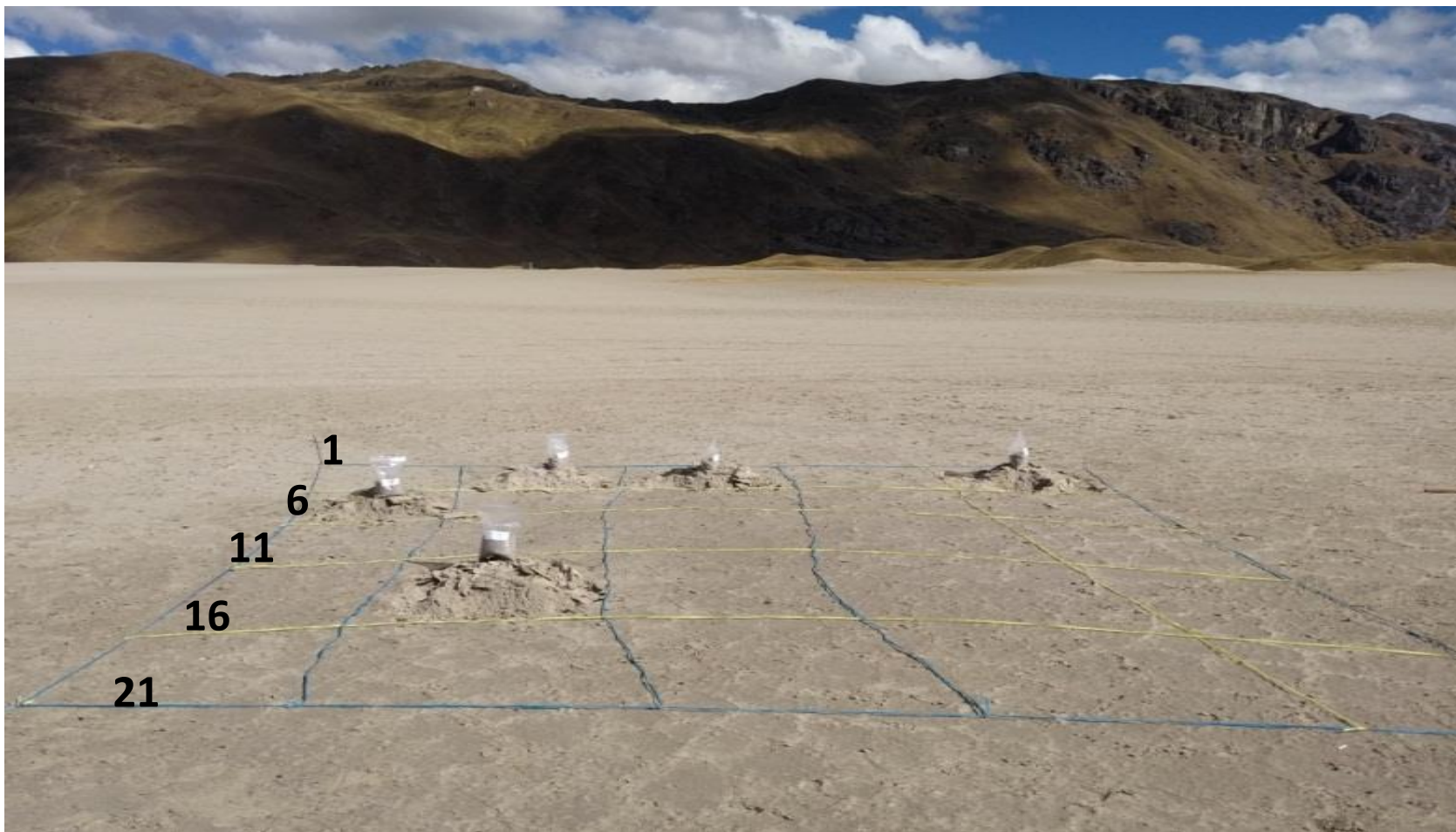


Figura 19 Cuadrícula 3 (C3) y muestras en los cuadrantes 2, 3, 5, 6 y 17. Fuente. Imagen tomada por el autor.

Se recuperó 91 hongos filamentosos de 15 muestras del relave Carhuacayán, , considerado como pasivo ambiental, los resultados indican la presencia de hongos en muestras de relave (ver cuadro 3).

Cuadro 3. 91 hongos aislados del relave Carhuacayán, en tres zonas representativas cuadrícula 1, 2 y 3.

DILUCIÓN	CUADRÍCULA 1	CUADRÍCULA 2	CUADRÍCULA 3	TOTAL
-1	10	3	24	37
-2	20	6	15	41
-3	6	1	3	10
-4	2	0	1	3
	38	10	43	91

Fuente. Elaborado por el autor.

En C2 existe una baja cantidad de recuperación de hongos en comparación a C1 y C3. Llacza y Castellanos (2020) encontraron que las coloraciones pardas de las muestras de relave en C2 presentan pH ácido en comparación de las de color naranja claro C1 y gris de C3, las cuales presentaron pH neutro. También encontraron que la concentración de plomo fue de 3 420.8 ppm para C1, 3 789.3 ppm – C2 y 4 323.0 ppm – C3 sobrepasando ampliamente el límite permitido para suelo industrial (800 mg/kg) dispuesto en el DS N°011-2017-MINAM, lo que indica una elevada presencia de contaminantes entre ellos metales pesados como el plomo. Se puede notar que la biodisponibilidad es más elevada en C2, comparada con C1 y C3, debido al pH bajo que presenta, induciendo fenómenos de absorción en el sustrato (García et., al 2002). A pesar de que en la mayor parte del relave existe pH neutro, baja biodisponibilidad de metales, no existe desarrollo de organismos esto indicaría que la concentración de metales tóxicos presentes contribuye en la eliminación o inhibición el crecimiento de organismos (McBride y Hendershot 1997; Harter, 1983).

Los residuos de la actividad minera depositadas sobre el suelo traen como consecuencia un impacto en sus características, convirtiéndolo en un suelo contaminado sobrepasando su capacidad de amortización de contaminantes, estos residuos se convierten en un problema por la emisión de contaminantes al suelo, agua y atmosfera por emanación o escurrimiento (Macias, 1993), Los contaminantes tales como los metales pesados ejercen una presión en los ecosistemas del suelo desplazando toda las poblaciones hacia los alrededores del área impactada y estas ejercen otra presión para recuperar los espacios perdidos (Garcia et., al 2002).

El problema de los residuos mineros ha sido vista como una oportunidad para investigadores peruanos quienes pretenden desarrollar biotecnología en la recuperación o eliminación de metales pesados a partir de estos desechos mineros en estado de abandono, teniendo en cuenta que somos un país históricamente un país minero. Arrieta (2019) en la región Junín aisló de 6 muestras de sedimento y 6 de agua 20 hongos a partir de: La laguna Santa Catalina, Relavera Huarón, relavera Carhuacayan, río San Juan, relavera Yanamate y relavera Milpo, el pH de las muestras varió de pH ácido a neutro y la concentración de los metales encontrados sobrepasan los estándares de calidad para el suelo según DS N° 011-2017-MINAM; Meza (2017) aisló 46 cepas fúngicas de muestras de sedimento y agua recolectadas de ambientes impactados por la actividad minera en la provincia Yauli – Junín. En Ancash Muñoz et., al (2019) aislaron 22 hongos filamentosos de cuatro muestras de suelo en un pasivo minero de la planta concentradora Santa Rosa de Jangas de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo, las muestras presentaron pH neutro a alcalino y plomo en concentraciones elevadas. Los reportes indican que existen hongos filamentosos nativos en ambientes contaminados que presentan tolerancia y resistencia a condiciones extremas de contaminación. Existen otros reportes de aislamientos de hongos resistentes metales pesados; Cárdenas et., al (2010) en México, aislaron 23 especies de hongos de muestras de drenaje

ácido de mina tomadas de ríos de la Huasteca Potosina: Coy, Amajac, Tamazunchale, Valles, Tamuín, Bancote, La galera y Santa Rosa; Sanchez et., al (2014) aislaron de la mina el Alacrán en Córdoba – Colombia a partir de 10 muestras de suelo al azar a 330 metros de la entrada de la mina de donde lograron aislar una cepa fúngica.

Como se puede observar existen trabajos nacionales e internacionales que ya están aislando microorganismos ganando interés los hongos con la finalidad de ser empleados en procesos biotecnológicos.

Evaluación del crecimiento fúngico expuesto a plomo

La frecuencia de crecimiento de los 91 hongos expuestos a tres concentraciones de plomo (1.25, 1.75, 2.25 g/l) presenta una gráfica sesgada a la derecha, muestra una relación inversamente proporcional entre el crecimiento y la concentración de plomo (ver figura 20) de la misma forma se puede observar la tolerancia de los hongos expuestos a las tres concentraciones mencionadas, presenta una gráfica sesgada a la izquierda (ver figura 21).

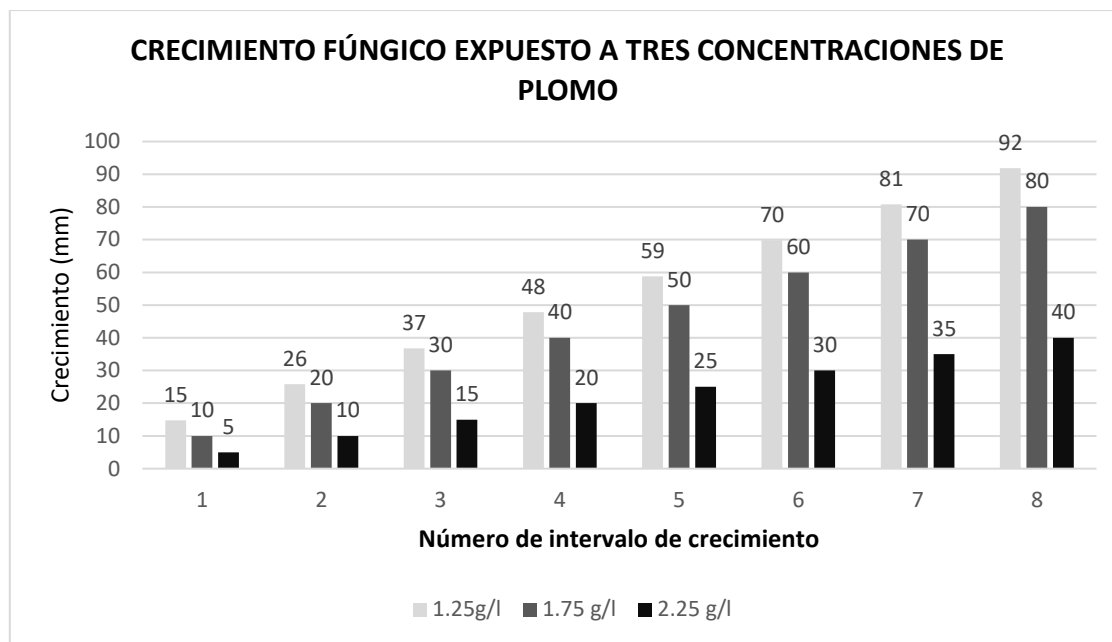


Figura 20 Influencia del plomo a tres concentraciones en el crecimiento de los hongos, relave Carhuacayán. *Fuente.* Imagen tomada por el autor

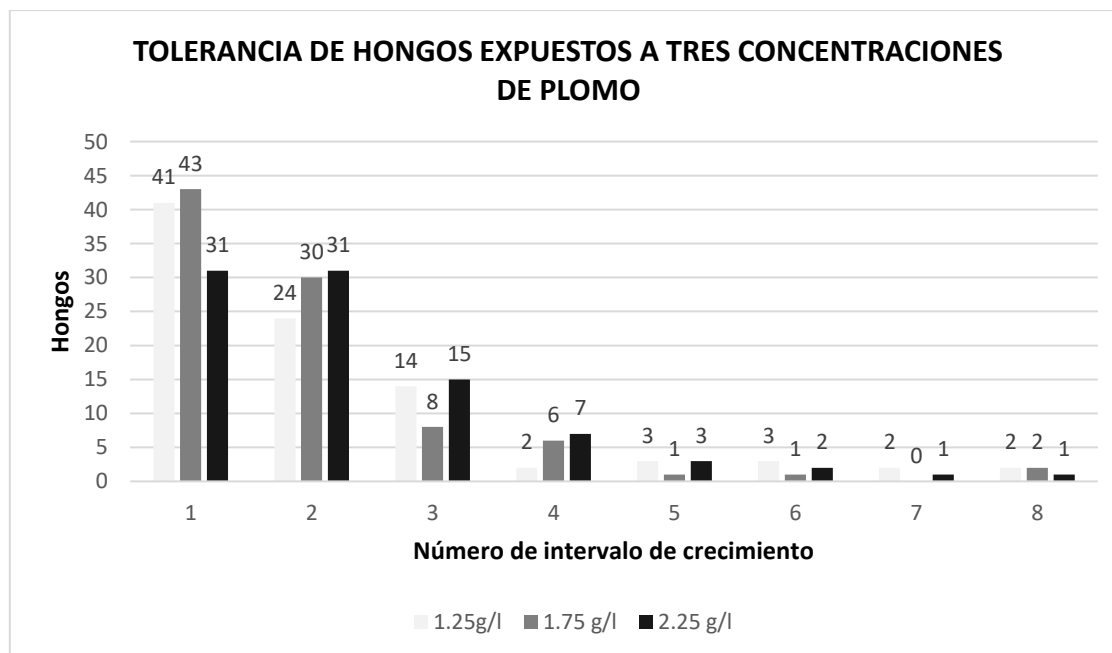


Figura 21 Evaluación de la tolerancia de los hongos frente a tres concentraciones de plomo, relave Carhuacayán. *Fuente.* Imagen tomada por el autor

65 hongos (71%) crecieron entre 4 – 26 mm en una concentración de 1.25 g/l de plomo 73 hongos (80%) creció entre 0 – 20 mm a 1.75 g/l y 62 hongos (68%) creció entre 0 – 10 mm para la concentración de 2.25 g/l de plomo (ver cuadro 4, 5 y 6).

Cuadro 4. Frecuencia de crecimiento fúngico en agar Czapeck – plomo 1.25 g/l.

1.25 g/l							
N	Intervalos de crecimiento		Crecimiento mm	Frecuencia	Frecuencia acumulada	% de Frecuencia	% acumulado
1	4	15	15	41	41	45%	45%
2	15	26	26	24	65	26%	71%
3	26	37	37	14	79	15%	87%
4	37	48	48	2	81	2%	89%
5	48	59	59	3	84	3%	92%
6	59	70	70	3	87	3%	96%
7	70	81	81	2	89	2%	98%
8	81	92	92	2	91	2%	100%

Fuente. Elaborado por el autor.

Cuadro 5. Frecuencia de crecimiento fúngico en agar Czapeck – plomo 1.75 g/l

1.75 g/l							
N	Intervalos de crecimiento		Crecimiento mm	Frecuencia	Frecuencia acumulada	% de Frecuencia	% acumulado
1	0	10	10	43	43	47%	47%
2	10	20	20	30	73	33%	80%
3	20	30	30	8	81	9%	89%
4	30	40	40	6	87	7%	96%
5	40	50	50	1	88	1%	97%
6	50	60	60	1	89	1%	98%
7	60	70	70	0	89	0%	98%
8	70	80	80	2	91	2%	100%

Fuente. Elaborado por el autor.

Cuadro 6. Frecuencia de crecimiento fúngico en agar Czapeck – plomo 2.25 g/l

2.25 g/l							
N	Intervalos de crecimiento		Crecimiento mm	Frecuencia	Frecuencia acumulada	% de Frecuencia	% acumulado
1	0	5	5	31	31	34%	34%
2	5	10	10	31	62	34%	68%
3	10	15	15	15	77	16%	85%
4	15	20	20	7	84	8%	92%
5	20	25	25	3	87	3%	96%
6	25	30	30	2	89	2%	98%
7	30	35	35	1	90	1%	99%
8	35	40	40	1	91	1%	100%

Fuente. Elaborado por el autor

El análisis de varianza ANOVA al 95% de confianza mostró que el promedio de crecimiento de las tres concentraciones de plomo por lo menos uno es diferente. La probabilidad valor (p) fue de 0.1×10^{-9} menor que el nivel de significancia (α) 0.05 y el estadístico de prueba (F) fue de 25.10 mayor al valor crítico F (3.029), (ver cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza al 95% confianza, para determinar diferencias en el promedio de crecimiento, relave Carhuacayán.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	10242.984	2	5121.49	25.10	0.1×10^{-9}	3.029218067
Dentro de los grupos	55086.314	270	204.02			
Total	65329.298	272				

Fuente. Elaborados por el autor

La prueba de TUKEY muestra que hay diferencia en el promedio de crecimiento de los hongos entre las tres concentraciones de plomo, de acuerdo con la diferencia honestamente significativa (HSD) 4.96. El resultado revela que existe una diferencia entre todas las concentraciones 1.25, 1.75 y 2.25 (ver cuadro 8).

Cuadro 8. Prueba de TUKEY para determinar la diferencia en el promedio de crecimiento en el relave Carhuacayán.

RELAVE CARHUACAYAN				
HSD		1.25	1.75	2.25
	1.25		9.27	14.85
4.96	1.75	9.27		5.58
	2.25	14.86	5.58	

Fuente. Elaborados por el autor

Así como muchas poblaciones de microorganismos son eliminadas y desplazadas a ambientes sin contaminación o poco contaminados cuando se depositan agentes tóxicos para la vida en el suelo, también existen organismos que logran adaptarse, ser tolerantes o indiferentes a las concentraciones de agentes tóxicos (Vadkertiova y Slavikova, 2006; Gadd, 1993) por lo que es interesante para los investigadores conocer el tipo de adaptación que presenta microorganismos y el potencialidad para el desarrollo de tecnologías que permitan recuperar ambientes degradados por la contaminación, es importante conocer la influencia que tiene el plomo en el crecimiento de las 91 cepas fúngicas aisladas a tres concentraciones de plomo. En medio de cultivo mínimo mineral, agar Czapek-glucosa a tres concentraciones de nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$): 1.25 (3.8 mM), 1.75 (5.2mM) y 2.25 (6.7mM) g/l y pH neutro, el crecimiento disminuye según la concentración de plomo aumenta en la relavera Carhuacayán; también se puede observar que más del 50% de los hongos evaluados, 65 hongos – 71%, crecen de 4 – 26 mm a 1.25 g/l de plomo, a 1.75 g/l, 73 hongos (80%) crecen en un rango de 0 – 20 mm y a concentración de 2.25 g/l, 62 hongos (68%) crece entre 0 – 10 mm. Autores como Ezzouhri et al., (2009) aislaron 24 hongos de muestras de agua y sedimentos de cinco ambientes contaminados en el Río Moghogha (Tánger, Marruecos) y fueron evaluados en su tolerancia empleando agar papa dextrosa incorporando 1mM de Pb, encontraron que más de la mitad de los aislados presentaron buena tolerancia a

la concentraciones de plomo evaluada. Muños et al., (2019) Aislaron de un pasivo minero 22 hongos filamentosos ubicado en la planta concentradora Santa Rosa de Jangas (Ancash-Perú), su tolerancia fue evaluada en placas 54nvir con LPSA suplementado 1.0 mM de Pb^{+2} ($Pb(NO_3)_2$), encontraron que el 70% de los hongos 54nviro alta tolerancia a 1mM de plomo, los mejores resultados presentaron *Fusarium oxysporum* CTLM17, *F. temperatum* CTLM05 y *F. oxysporum* CTLM18. Muños et al., (2012) aislaron 48 cepas de hongos, levaduras y bacterias, muestras de una planta de tratamiento de aguas residuales con un intenso trasfondo de actividad minera y de industria papelera, de los aislados, 10 cepas especialmente de aguas residuales presentaron mejor tolerancia a plomo en medio PDA contaminado con 1 mM de Pb ($Pb(NO_3)_2$), encontrando mayor número hongos y levaduras con mejor tolerancia al plomo. Siddiquee et al., (2013) evaluaron la tolerancia da Pb ($Pb(NO_3)_2$) de cuatro muestras de *Trichoderma* a concentraciones de 100, 300, 500, 700, 900 y 1200 mg /l, encontraron que la tasa de crecimiento disminuye entre la primera concentración y la última en 1.3 aproximadamente. Joo y Hussein., 2012 aislaron hongos de cuatro muestras de suelos mineros de los cuales siete fueron evaluados en su crecimiento en medio de cultivo agar Czapek con adición de Pb en una concentración de hasta de 800 ppm, encontrando buenos valores de crecimiento. Los trabajos mencionados anteriormente mencionan la existencia de hongos tolerantes a concentraciones de plomo aislados de muestras contaminadas y evaluadas en diferentes medios de cultivo, por lo que podemos decir que se puede encontrar cepas fúngicas nativas con buena tolerancia al plomo. Hay que tener en cuenta que cada hongo reacciona de manera independiente a cada metal según lo refiere Anahid et al., (2011), conclusión a la que llego al evaluar la resistencia de *Aspergillus niger* BBRC, *Aspergillus foetidus* ATCC y *Penicillium simplicissimum* BBRC cuando fueron expuestos a Ni, Co, Mo, V, Mn, Fe, W y Zn, en agar 54nviron extracto de levadura expuestos a 8 g/l de metal pesado, los resultados en este trabajo muestran que los hongos evaluados presentan tolerancia al plomo en cultivo mineral mínimo, indicando que son poco exigentes para su crecimiento. El programa Microsoft Excel 2010 fue empleado para

realizar la prueba ANOVA a un 95% de confianza para los hongos de la relavera Carhuacayán que fueron expuestos a concentraciones de plomo (1.25, 1.75 y 2.25 g/l), los resultados muestran que el promedio de crecimiento en las tres concentraciones de plomo por lo menos uno es diferente. De manera complementaria se realizó la prueba de TUKEY para determinar las diferencias que existen en el promedio de crecimiento de los hongos entre las tres concentraciones de plomo evaluadas, La prueba mostró que para el relave Carhuacayán, hay diferencia en el promedio de crecimiento entre cada concentración de plomo evaluada. El ANOVA y TUKEY fueron empleados para las tres cuadrículas. Los diez hongos que presentaron mejor crecimiento a la concentración de plomo ($\text{Pb (NO}_3)_2$) 2.25 g/l. Se identificaron mediante características morfológicas macroscópicas y estructuras reproductivas microscópicas empleando claves de identificación según Barnett y Barry, 1999 (ver cuadro 9).

Cuadro 9. Identificación de hongos seleccionados y evaluación del CMI.

AGAR CZAPECK – PLOMO (g/l) pH 5.5									
N	CEPA	IDENTIFICACION	0	1.25	1.75	2.25	2.75	3.25	3.75
1	CRH 1408	<i>Paecilomyces sp.</i>	44	38	30	22	10	0	0
2	CRH 1409	<i>Paecilomyces sp.</i>	52	30	18	8	0	0	0
3	CRH 522	<i>Paecilomyces sp.</i>	68	54	66	22	6	0	0
4	CRH303	<i>Paecilomyces sp.</i>	90	90	90	20	10	0	0
5	CRH 1405	<i>Epidermophyton sp.</i>	22	18	15	10	8	8	0
6	CRH 401	No identificada	36	27	14	12	10	0	0
7	CRH 1411	<i>Acremonium sp.</i>	90	90	90	0	0	0	0
8	CRH302	<i>Scopulariopsis sp.</i>	38	34	36	0	0	0	0
9	CRH 508	<i>Penicillium sp.</i>	80	26	10	0	0	0	0
10	CRH 423	<i>Acremonium sp.</i>	76	28	7	0	0	0	0

Fuente. Elaborados por el autor

Cuatro cepas del género *Paecilomyces* sp., un *Epidermophyton* sp., dos *Acremonium* sp., un *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp y una no identificada fueron identificadas.

Género *Paecilomyces*: presenta estructuras reproductivas asexuales presentan conidióforos irregulares y verticilados, fialide cilíndricas o dilatadas que terminan en un largo y delgado cuello (lo diferencia de *Penicillium*) que producen cadenas desordenadas de conidios sub esféricos a elipsoidales (ver figura 22, 23, 24 y 25).

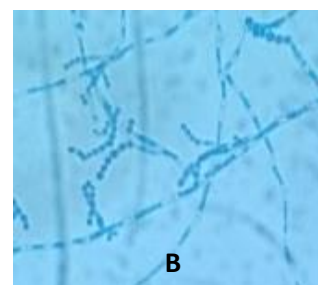
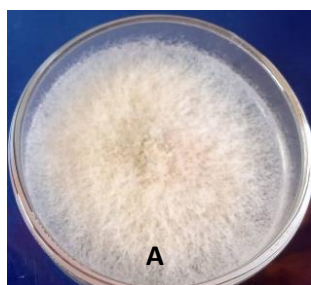


Figura 22 Cepa CRH1408 Género *Paecilomyces*, A: macrocultivo B: microcultivo. Fuente. Imagen tomada por el autor.

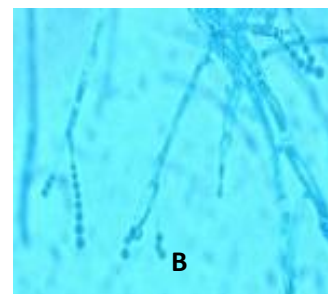
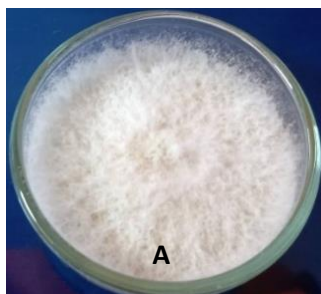


Figura 23 Cepa CRH1409 Género *Paecilomyces*, A: macrocultivo B: microcultivo. Fuente. Imagen tomada por el autor.

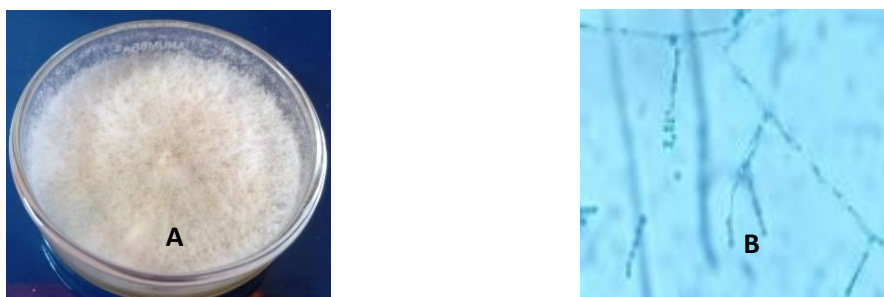


Figura 24 Ceba CRH522 Género *Paecilomyces*, A: macrocultivo B: microcultivo. Fuente. Imagen tomada por el autor.



Figura 25 Ceba CRH303 Género *Paecilomyces*, A: macrocultivo B: microcultivo. Fuente. Imagen tomada por el autor).

Género *Epidermophyton*: perteneciente al filo Ascomycota, sus estructuras reproductivas presentan macroconidios en racimos en abundancia, presenta pared gruesa y lisa de extremos romos, otorgándole un aspecto de maza, no presenta microconidios. En cultivos de varias semanas presenta hifas en forma de raqueta y clamidosporas (ver figura 26).



Figura 26 Cepa CRH1405 Género *Epidermophyton*, A: macrocultivo B: microcultivo. Fuente. Imagen tomada por el autor.

Género *Acremonium*: presentan hifas finas e hialinas, producen principalmente fialide simples. Los conidios son generalmente unicelulares (ameroconidios), hialinos o pigmentados, de globosos a cilíndricos y en su mayoría agregados con cabezas viscosas en el ápice de cada fialide (ver figura 27 y 28).

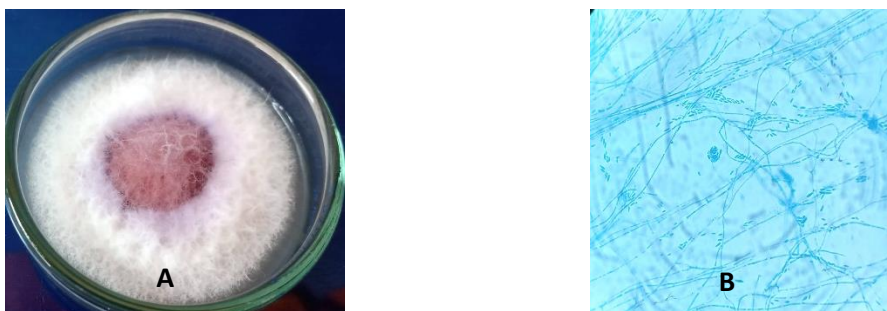


Figura 27 Cepa CRH423 género *Acremonium*, A: macrocultivo B: microcultivo. Fuente. Imagen tomada por el autor.

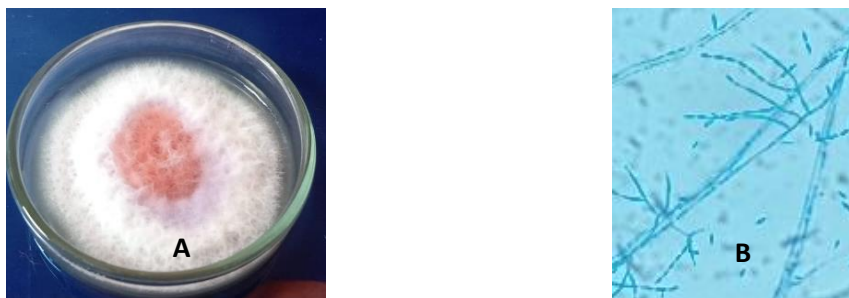


Figura 28 Cepa CRH1411 género *Acremonium*, A: macrocultivo B: microcultivo. Fuente. Imagen tomada por el autor.

Género *Scopulariopsis*: presenta cadenas de conidios unicelulares producidos en sucesión basípeta a partir de una célula conidiógena especializada llamada annelida. Los annellides pueden ser solitarios, en grupos u organizados en un penicillus distinto. Los conidios son globosos a piriformes, generalmente truncados, con una porción distal redondeada, lisa a rugosa y de color hialino a marrón (ver figura 29).



Figura 29 Cepa CRH302 género *Scopulariopsis*, A: macrocultivo B: microcultivo. Fuente. Imagen tomada por el autor.

Género *Penicillium*: conidióforos que surgen del micelio solos o con menos frecuencia en sinnemas, ramificados cerca del ápice, penicilados, terminados en un grupo de fialida; conidias (fialosporas) hialinas o de color brillante en masa, celuladas, en su mayoría globosas u ovoides, en cadena basípeta seca (ver figura 30).

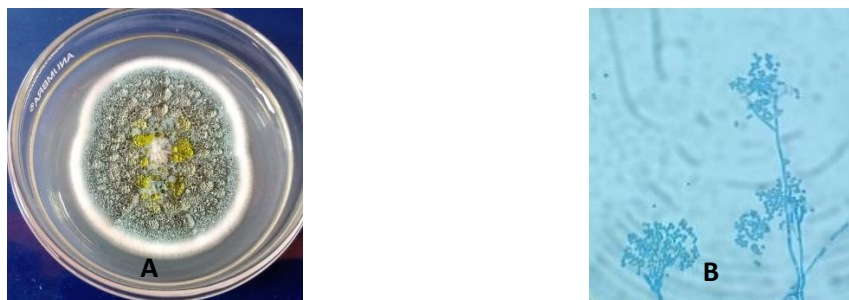


Figura 30 Ceba CRH508 género *Penicillium*, A: macrocultivo B: microcultivo. Fuente. Fuente. Imagen tomada por el autor.

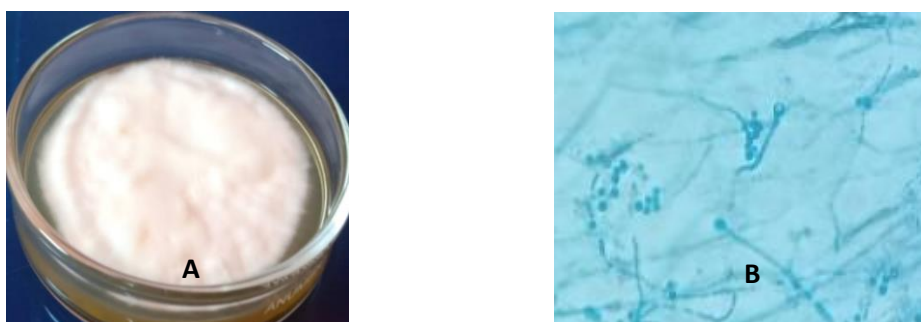


Figura 31 Ceba CRH401 no identificada, A: macrocultivo B: microcultivo. Fuente. Fuente. Imagen tomada por el autor.

Diez hongos fueron seleccionados por presentar mejor tolerancia – crecimiento en concentración de plomo (2.25 g/l) (ver cuadro 10), los cuales fueron identificados según claves taxonómicas de Barnett y Barry (1999) pertenecen a los géneros de *Paecilomyces* sp., *Epidermophyton* sp., *Scopulariopsis* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp. y una no identificada.

Cuadro 10 Cepas seleccionadas que presentaron mejor crecimiento (mm) a tres concentraciones de plomo (Pb (NO₃)₂).

N	CEPA	PLOMO (g/l)		
		1.25	1.75	2.25
1	CRH 1408	67	40	38
2	CRH 1409	65	45	33
3	CRH 522	35	34	28
4	CRH303	78	60	27
5	CRH 1405	32	28	22
6	CRH 401	27	23	21
7	CRH 1411	37	30	20
8	CRH302	56	37	19
9	CRH 508	91	71	19
10	CRH 423	91	73	18

Fuente. Elaborados por el autor

La identificación de hongos aislados de ambientes contaminados con tolerancia a plomo también ha sido reportada por otros autores como: Cárdenas (2010) quien aisló hongos de muestras de agua de los géneros *Curvularia* sp., *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., y *Penicillium* sp; Ezzouhri et al., (2009) de muestras de agua y sedimentos de ambientes contaminados por minería, identificando géneros de hongos como *Fusarium* sp., *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum* y *Penicillium*; Ho Joo y Hussein (2012) tomaron muestras de suelo de minero de donde aislaron géneros *Penicillium notatum*, *Saccharomyces serviciae*, *Rhodosporidium toruloides*, *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum*, *Pencillium funiculosum*, *Penicillium glabrum* por último Iskandar et al., (2011) géneros de *Aspergillus niger*, *Penicillium simplicissimum* y *Trichoderma asperellum* en muestras de agua de río contaminada con desechos municipales e industriales. Se puede observar que existe géneros que se aíslan con frecuencia de ambientes contaminados como es el género *Penicillium*, *fusarium*, pero hay otros que son nuevos como son los géneros de *Paecilomyces*

sp., *Epidermophyton* sp., *Scopulariopsis* sp, *Cephalosporium* sp y una no identificada.

La cepa CRH 1405 identificada como *Epidermophyton* sp, presentó mejor CMI creciendo a 3.75g/l de plomo seguida de las siguientes cepas CRH 1408-*Paecilomyces* sp, CRH303-*Paecilomyces* sp, CRH 401-No identificada y CRH 522-*Paecilomyces* sp creciendo a 2.75g/l, CRH 1409-*Paecilomyces* sp a 2.25g/l, y CRH 1411- *Acremonium* sp, CRH 302- *Scopulariopsis* sp, CR 508- *Penicillium* sp y CRH 423- *Acremonium* sp a 1.75g/l (ver figura 32 y cuadro11).

Cuadro 11. Concentración Mínima inhibitoria (CMI) de hongos seleccionados expuestos al plomo.

N	CEPA	GÉNERO	CMI (g/l)	
1	CRH 1408	<i>Paecilomyces</i> sp.	2.75	3.25
2	CRH 1409	<i>Paecilomyces</i> sp.	2.25	2.75
3	CRH 522	<i>Paecilomyces</i> sp.	2.75	3.25
4	CRH303	<i>Paecilomyces</i> sp.	2.75	3.25
5	CRH 1405	<i>Epidermophyton</i> sp.	3.25	3.75
6	CRH 401	No identificada	2.75	3.25
7	CRH 1411	<i>Acremonium</i> sp.	1.75	2.25
8	CRH302	<i>Scopulariopsis</i> sp.	1.75	2.25
9	CRH 508	<i>Penicillium</i> sp.	1.75	2.25
10	CRH 423	<i>Acremonium</i> sp.	1.75	2.25

Fuente. Elaborado por el autor.

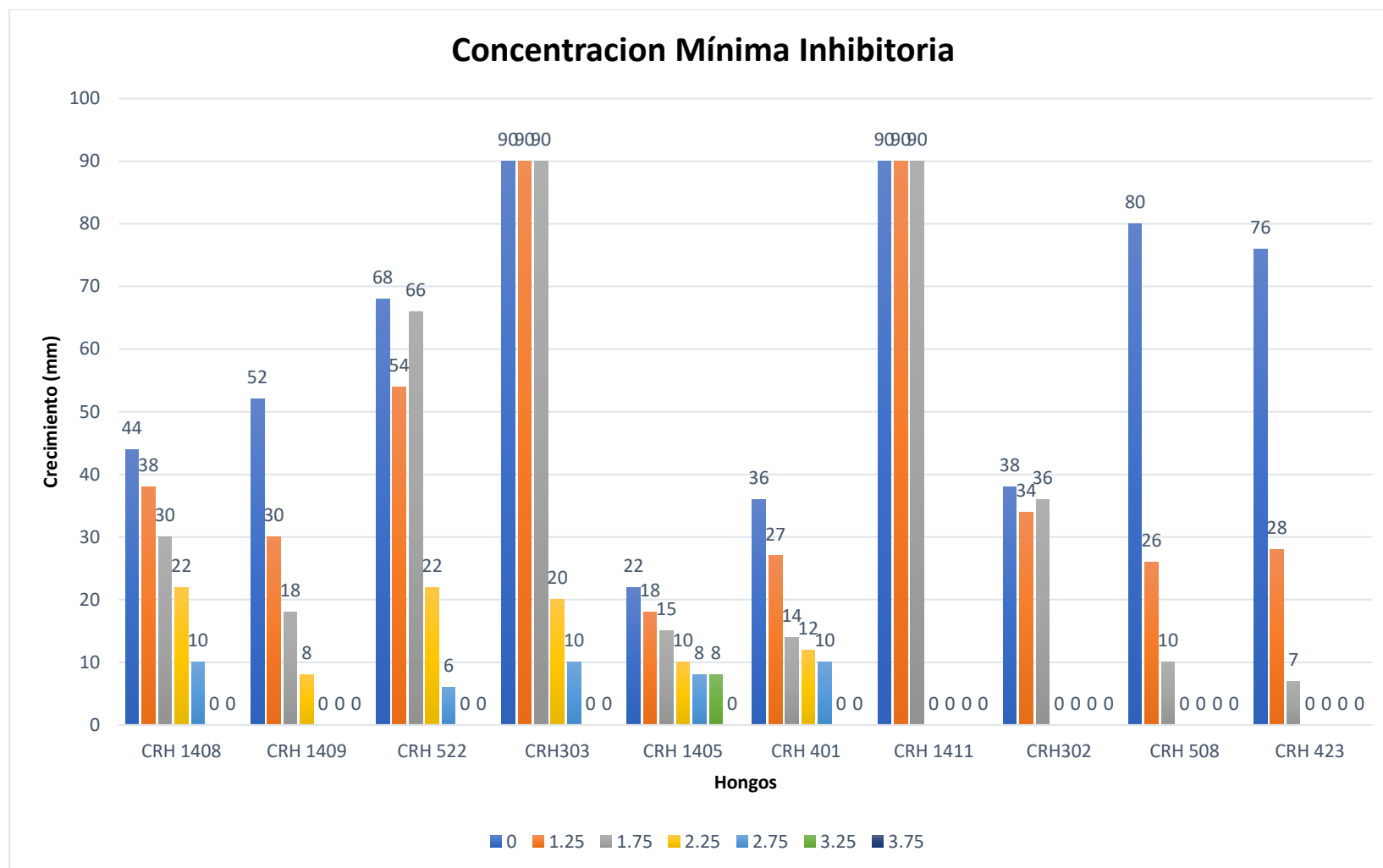


Figura 32 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del crecimiento de los hongos seleccionados en medio Czapeck – (Pb (NO₃)₂), pH 5.5. Fuente. Laboratorio de Micología Aplicada UNMSM (2019).

Es probable que los hongos aislados hayan pasado por un proceso de adaptación a las condiciones hostiles presentes en las muestras de relave, desarrollando cambios en su morfología, fisiología, genética inducida por la presencia de plomo y otros contaminantes (Gadd y Griffiths, 1978; Gadd, 1993; Llacza y Castellanos, 2020). Los hongos evaluados presentan tolerancia a tres concentraciones de plomo y diez han sido evaluados en su concentración mínima inhibitoria. Los resultados muestran que las cepas evaluadas presentaron el siguiente comportamiento: CRH 1405 identificada como *Epidermophyton* sp, presentó el mejor CMI creciendo a 3.75g/l de plomo seguida de las siguientes cepas CRH 1408-*Paecilomyces* sp, CRH303-*Paecilomyces* sp, CRH 401-No identificada y CRH 522-*Paecilomyces* sp creciendo a 2.75g/l, CRH 1409-*Paecilomyces* sp a 2.25g/l, y CRH 1411- *Acremonium* sp, CRH 302- *Scopulariopsis* sp, CR 508- *Penicillium* sp y CRH 423- *Acremonium* sp a 1.75g/l. Autores como Velmurugan et al., (2010) han estudiado la adaptación de los hongos, encontrado a *Penicillium* sp. MRF-1 que pueden crecer a concentraciones de plomo hasta de 1,24 g/l en caldo de cultivo 64nviron dox; Zucconi et al. (2003) a *Paecilomyces lilacinus* crece en medio de cultivo liquido Czapek Dox a concentraciones de 1.434 g/l de Pb; Siddiquee et al., (2013) la cepa T32 de *T. harzianum* que puede crecer a concentración de 1.2 g/l de plomo en medio de cultivo agar papa dextrosa; Morales y Ruiz (2008) *Phanerochaete chrysosporium* presento la mayor tolerancia frente al acetato de plomo (10.0 g/l) en medios de cultivo medio Radha; Iskandar et al. (2011) encontraron que *Aspergillus niger* crece en agar papa dextrosa a 5.0 g/l de plomo. Evaluaciones de optimización podrían elevar la tolerancia de los hongos seleccionados, probando diferentes fuentes de carbono teniendo como base el medio mínimo mineral Czapeck y factores fisicoquímicos del medio de cultivo como el pH y la temperatura de crecimiento.

Evaluación de la biosorción de plomo por biomasa viva

La capacidad de sorción de plomo en hongos nativos del relave Carhuacayán fue evaluada durante su crecimiento, en medio de cultivo mínimo con agregado de plomo 1 ppm, teniendo como cepas en evaluación CRH522 – *Paecilomyces*; CRH303 – *Paecilomyces*; CRH 140 – *Epidermophyton* estas presentaron buenos resultados en la evaluación de su CMI.

Los resultados indican que las cepas evaluadas presentan mayor capacidad de sorber plomo al segundo día de evaluación, *Paecilomyces* en el día dos presentan un porcentaje de sorción de 88% un 2% mayor al de *Epidermophyton* que presentó 78%, los hongos evaluados presentan su mayor porcentaje de sorción en el día seis teniendo a las cepas de *Paecilomyces* un porcentaje de sorción de 89 y 90% en comparación de *Epidermophyton* que presentó 88%, (ver cuadro 12 y figura 33).

Cuadro 12. Evaluación de la biosorción de plomo durante el crecimiento de tres hongos en cultivo liquido Czapeck – Plomo.

N	GÉNERO	CEPA	DIA							
			0		2		4		6	
			Pb ug/l	Pb ug/l	% SORCIÓN	Pb ug/l	% SORCIÓN	Pb ug/l	% SORCIÓN	
1	Paecilomyces sp.	CRH 522	863.9	107.6	88%	101.3	88%	94.1	89%	
2	Paecilomyces sp.	CRH303	841.9	103.0	88%	95.0	89%	85.3	90%	
3	Epidermophyton sp.	CRH 1405	853.4	191.7	78%	158.3	81%	102.6	88%	
5		BLANCO	825.5	832.5	--	824.2	--	825.8	--	
6	Aspergillus sp.	NEGATIVO	970.3	975.8	--	973.9	--	976.8	--	

Fuente. Elaborado por el autor.

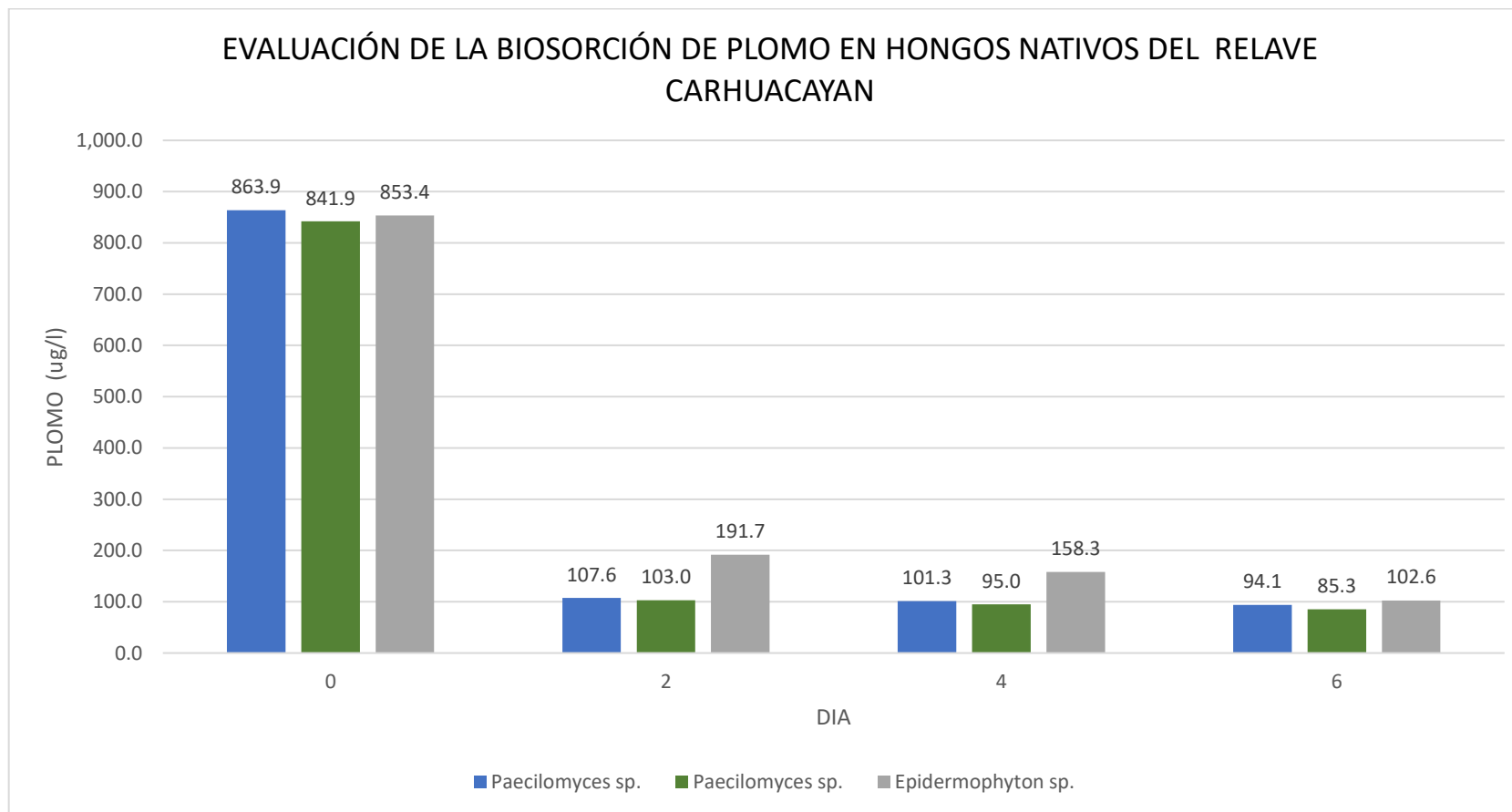


Figura 33 Biosorción de plomo de tres cepas nativas fúngicas, en seis días de evaluación. *Fuente.* Elaborado por el autor.

El proceso de biosorción de metales pesados como el plomo sucede cuando el plomo se acumula en compartimentos al interior de la célula o se adhiere en la pared celular, su acumulación hasta cierta cantidad de plomo será tolerable y podrá seguir desarrollándose en el sustrato donde se encuentre (Sun y Shao, 2007). Solís et al., (2015) indican que se puede encontrar un medio de cultivo óptimo para mejorar la sorción de plomo durante el crecimiento, así como que la concentración del metal influye en el porcentaje de sorción, encontraron que el porcentaje de sorción de plomo subió de 43.3% a 86.3% cuando el metal inicial cambio de 0.50 a 0,25 ppm en cepas de *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 32629 y *Trametes versicolor* ATCC 12679. Zucconi et al., (2003) estudiaron la sorción de Pb por biomasas vivas y muertas de *Paecilomyces lilacinus*; (expresada en mg Pb g/1 peso seco), encontraron que la sorción de Pb de ambos micelios aumentó con el tiempo de exposición, y mostraron un comportamiento diferente tanto en las tasas como en las cantidades totales captadas al final del tiempo de exposición (72 h), la sorción de Pb por micelio muerto fue de 2,17% de su peso seco, sorbido pasivamente y una sorción activa por el micelio vivo 3,03% de su peso seco, por lo que existe una diferencia de sorción superior de la biomasa viva con respecto a la biomasa muerta, presentando mejores valores (Zucconi et al., 2003). Por otro lado, valores de biosorción encontrados por Solís et al., (2015) por la cepa *T. versicolor* ATCC 12679 fue de 0.25, 1 y 2 mg/l a partir de una concentración inicial de 0.25, 1 y 2 mg/l. La biosorción de plomo se puede incrementar optimizando el medio de cultivo en las cantidades de su composición y parámetros fisicoquímicos como el pH, temperatura, concentración de metal, agitación entre otros.

Los porcentajes de sorción de plomo obtenidos llegan al 90% presentando similitud a los obtenidos con biomasa seca o muerta, Cárdenas et al., (2013) encontró que *Mucor rouxii* mutante, *M. rouxii* IM-80, y *Mucor* sp-1 y 2 presentaron 100%, 94.1%, 93.1% y 86.3% respectivamente, a un pH 6.0, 100 rpm/12 horas y 1.0 g de biomasa fúngica por cada 100 ml de solución de plomo; Iskandar et al., (2011) encontró *A. niger*, *P. simplicissimum* y *T. asperellum* tienen una mejor capacidad de sorción de Pb, 54.0; 17.6 y

38.6mg/g respectivamente, a una concentración inicial de 250 mg/l de plomo; Sánchez et al., (2014) reportaron que a 51.5 mg/l de Cd y Pb se consigue una mayor remoción con 0.5 g de biomasa, el pH óptimo fue ácido entre 4-5 a 60 °C, logrando una remoción de 92.4% para Pb y 80% para Cd, el análisis IR reveló que los grupos –OH, –NH, C-N, C-H, N-H, C=O, amida I, amidas II y polisacáridos presentes en la biomasa fúngica intervienen en la capacidad de sorción de metales y Shazia et al., (2015) comprobaron que la capacidad de biosorción de Pb (II) en un rango de 200 a 1 400 ppm en *Aspergillus niger*, a un pH óptimo 4-5,4; temperatura óptima de 37 °C, la capacidad de biosorción de Pb (II) osciló entre 3,25 y 172,25 mg / g.

4.2 Prueba de hipótesis

4.2.1 *Hipótesis general.*

En la relavera Carhuacayán existen hongos con propiedad de tolerar y sorber plomo con potencial biotecnológico para reducir la contaminación por este metal.

- H_0 = En la relavera Carhuacayán no existen hongos con propiedad de tolerar y sorber plomo con potencial biotecnológico para reducir la contaminación por este metal.
- H_1 = En la relavera Carhuacayán si existen hongos con propiedad de tolerar y sorber plomo con potencial biotecnológico para reducir la contaminación por este metal.

Se aisló 91 cepas de hongos del relave Carhuacayán tolerantes hasta una concentración de 3.75 g/l de plomo y con capacidad de sorción de este metal del 90% en seis días de incubación, por lo expuesto se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alternativa (H_1).

4.2.2 Hipótesis específica

I.- El relave Carhuacayán presenta hongos tolerantes a plomo.

- H_0 = El relave Carhuacayán no presenta hongos tolerantes a plomo.
- H_1 = El relave Carhuacayán si presenta hongos tolerantes a plomo.

Se aislaron un total de 91 hongos filamentosos del relave de la mina Carhuacayán y fueron expuestos a concentraciones de plomo 2.25 g/l de plomo obteniendo crecimiento, por lo que se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alternativa (H_1).

II.- El plomo influye en el crecimiento de los hongos del relave Carhuacayán.

- H_0 = El plomo no influye en el crecimiento de los hongos del relave Carhuacayán.
- H_1 = El plomo si influye en el crecimiento de los hongos del relave Carhuacayán.

Se realizó el ANOVA a los valores de crecimiento de los hongos expuestos a plomo a tres concentraciones 1.25; 1.75 y 2.25 g/l, se encontró que el promedio de crecimiento para las tres concentraciones presenta diferencias y con la ayuda de la prueba complementaria de TUKEY se determinó que estos promedios eran diferentes entre las tres concentraciones con una diferencia honestamente significativa de 4.96 mm, también presentaron una CMI de hasta 3.75, por lo que se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alternativa (H_1).

III.- Los hongos del relave Carhuacayán presentan capacidad de biosorción de interés biotecnológico.

- H0 = Los hongos del relave Carhuacayán no presentan capacidad de biosorción de interés biotecnológico.
- H1= Los hongos del relave Carhuacayán si presentan capacidad de biosorción de interés biotecnológico.

Al evaluar la sorción de plomo en las cepas: CRH522 – *Paecilomyces*; CRH303 – *Paecilomyces* y CRH 140 – *Epidermophyton*, estas presentaron al sexto día de evaluación un porcentaje de biosorción de plomo del: 89, 90 y 88 % respectivamente, demostrando que, si presentan capacidad de biosorción y potencial biotecnológico, por lo que se rechaza la hipótesis nula (H0) y se acepta la hipótesis alternativa (H1).

4.3 Presentación de resultados.

4.3.1 Aislamiento de hongos del relave Carhuacayán.

Se aisló 91 hongos filamentos de tres áreas representativas del relave Carhuacayán, el relave presentaba en zonas de su superficie excretas de ganado ovino y vegetación circundante en el contorno desmoronamiento producido por las condiciones climáticas de la zona y por el tiempo que se encuentra en abandono (ver cuadro 1, 2 y 3). Los hongos fueron aislados por el método de las diluciones seriadas (ver figuras 11 y 12).

4.3.2 Influencia del plomo en el crecimiento de los hongos.

Se encontró que el plomo influencia en el crecimiento de los hongos en agar Czapeck – plomo a concentraciones 1.25; 1.75 y 2.25 g/l, con una reducción promedio en el crecimiento de (HSD) 4.96 mm entre cada concentración evaluada (ver cuadros 4, 5, 6, 7 y 8), También se observó que el comportamiento de las cepas evaluadas presentó una relación inversamente proporcional entre el crecimiento y la concentración de plomo (ver figura 20). De la evaluación se seleccionaron diez hongos que presentaron mejor crecimiento (ver cuadro 10) en donde se identificó cuatro cepas del género *Paecilomyces* sp., un *Epidermophyton* sp., dos *Acremonium* sp., un *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp y una no identificada fueron identificadas (ver cuadro 9 y figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31) la cepa CRH 1405 identificada como *Epidermophyton* sp. presento mayor concentración mínima inhibitoria 3.75 g/l (ver cuadro 11 y figura 32).

4.3.3 Evaluación de la biosorción de plomo.

Seleccionamos tres cepas CRH 522-*Paecilomyces*, CRH303-*Paecilomyces* y CRH 1405 *Epidermophyton* para evaluar la biosorción de plomo las cuales presentaron valores de 89, 90 y 88 % respectivamente al sexto día de incubación, el medio de cultivo fue Czapeck con concentraciones de plomo de 863.9, 841.9 y 853.4 ug/l (ver cuadro 12 y figura 33)

CONCLUSIONES.

- El relave Carhuacayán, ubicado en el distrito de Santa Bárbara de Carhuacayán Yauli – Junín uno de los pasivos ambientales del distrito, presenta hongos filamentosos con capacidad de biosorción de plomo, lo que indica que estos microorganismos pueden presentar adaptaciones de acuerdo a los contaminantes del pasivo ambiental.
- El aislamiento de 91 hongos filamentosos del relave Carhuacayán contaminado por metales pesados como el plomo, indica que los microorganismos de las áreas circundantes se encuentran ejerciendo una presión biológica para repoblar áreas de donde fueron retirados por el depósito de este material contaminado.
- Los hongos filamentosos aislados del relave Carhuacayán son afectados por las concentraciones de metales pesados como el plomo, inhibiendo su crecimiento, a la vez estos microorganismos han logrado una tolerancia a este metal pesado de 3.25 g/l del metal.
- Géneros fúngicos como *Paecilomyces*, *Epidermophyton*, *Acremonium*, *Scopulariopsis* son posibles de encontrar en la relavera Carhuacayán además de presentar resistencia al plomo algunos individuos pueden presentar excelente capacidad de sorción de plomo.

RECOMENDACIONES

- Antes de realizar trabajos de muestreo para el aislamiento de microorganismos debemos de realizar un análisis fisicoquímico de los contaminantes presentes en el sustrato a muestrear, para mantener las condiciones de campo cuando se procesen las muestras en laboratorio.
- Trabajos de aislamiento y evaluación de hongos filamentosos en áreas no contaminadas y áreas intermedias, podrían ayudar a entender mejor proceso de adaptación y la presión biológica de los microorganismos para recuperar espacios contaminados.
- Si se desea realizar una selección de una gran cantidad de hongos presuntamente tolerantes a metales pesados, realizar ensayos exploratorios y comparar resultados con bibliografía.
- Los estadísticos como el ANOVA y TUKEY son ideales para determinar diferencias entre promedios de los tratamientos en evaluación de una variable de ensayo.
- La biosorción por hongos filamentosos nativos es un área que tiene el potencial para poder desarrollar biotecnología en la recuperación de metales y puede ser de gran utilidad teniendo en cuenta que el Perú tiene gran potencial minero y su uso con el desarrollo de esta tecnología sea de manera sostenible.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul, Tawab, Khan, I. and Maqsood, Z. (2007). "Critical behavior of Iron (III) with a typical catecholate siderophore", *Sci. Iran.*, 14(2), pp. 106–111
- Aduvire, O. (2006). *Drenaje acido de mina generación y tratamiento*. Instituto Geológico y Minero, España.
- Akinbiyi, A. (2000). Removal of lead from aqueous solutions by adsorption using peat moss. (Thesis to Master). University of Regina. Saskatchewan, Canada.
- Akinkunmi, W. (2015). *Biosorption of Lead and Copper Ions in Aqueous Solutions using Biomass of Indigenous Fungal Isolates, Fusarium equiseti and Penicillium citrinum*. (Thesis for of Doctor of Philosophy). Universiti Malaysia Sarawak. Malaysia.
- Alloway, B. (1995) Chapter 2: Soil process and the behavior of the heavy metals. In: Alloway, B.J. (ed.). *Heavy metals in soils*. Blackie Academic and Professional, London, 2nd edition. Pp.11-37.
- Anahid, S., Yaghmaei, S., y Ghobadinejad, Z. (2011). Heavy metal tolerance of fungi. *Scientia Iranica*, 18(3), 502-508.
- Astete, J., Cáceres, W., Gastañaga, M., Lucero, M., Sabastizagal, I., Oblitas, T., Pari, J., y Rodríguez, F., (2009). Intoxicación por plomo y otros problemas de salud en niños de poblaciones aledañas a *relaves* mineros. *Peru Med Exp. Salud Publica*, 26 (1): 15-19.
- Arrieta, L. (2019). Biosorción de metales pesados por hongos filamentosos, aislados de cuerpos de agua altoandinos contaminados con relaves mineros de la sierra central del Perú. Tesis de pregrado. UNMSM – Peru.
- Aziz, T. (2015). A Mini Review on Lead (Pb) Toxicity in Plants. *Journal of Biology and Life Science*, 6, (2), 2157-6076.
- Barnett, H., y Barry, H., (1999). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. The American Phytopathological Society. St Paul Minnesota, Estados Unidos: Amer Phytopathological Society.

- Bayas, F. y Lopez A. (2017). *Comparación de la efectividad del hongo *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum* en la disminución de concentración de metales pesados en lodos de lixiviación de un relleno sanitario*. Tesis de pregrado. Escuela superior politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Basta, N. (2004). Heavy metal and trace element chemistry in residual-treated soil: Implications on metal bioavailability and sustainable land application. In: Sustainable land application Conference, January, 4-8, Florida; University of Florida.
- Baldrian, P. (2005). Interactions of heavy metals with white-rot fungi Enzyme and Microbial Technology 32 78–91.
- Bellion, M., Courbot M., Damien C., y Chalot M., (2006). Extracellular and environmental mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. Federation of European Microbiological Societies. 254: 173–181.
- Becerril, J., Munoz A., Aparicio P. y Gonzales C. (1988) The effects of cadmium and lead on photosynthetic electron transport in clover and lucerne. Plant Physiology and Biochemistry. 26, 357– 363.
- Blum, A. (1988) Plant breeding for stress environments. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bosecker K. (2001). Microbial leaching in environmental clean-up programs. Hydrometallurgy, 59(2-3), 245-248.
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M., y Scheckel, K. (2014). Remediation of heavy metal solids contaminated soils-to mobilize or to immobilize. Journal of Hazardous Material, 266: 141-166.
- Cano, M., Moreno A., y González, J., (1997). Evaluación de la contaminación por metales pesados en suelos de cultivo. *Ecología*, 11: 83 – 89.
- Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42: 131-143.

- Cárdenas, J., Moctezuma, M., y Rodríguez, I. (2010). Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de agua de diferentes ríos de la huasteca potosina. *Revista Académica de Investigación*.
- Cárdenas, J., Moctezuma, M., Acosta, I., y Martínez, V., (2013). Biosorción de Plomo (II) en solución por diferentes biomasas. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 9 (1): 57-61.
- Castro, C. (1998). Estudios de remoción de Cadmio y Plomo de aguas residuales industriales por adsorción empleando arcillas. Tesis pregrado. Colombia.
- Cerino F., García A., García R., Garza M., Soto E., Sánchez M., Quezada I. (2011). Response surface methodology for lead biosorption on *Aspergillus terreus*. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 8 (4), 695-704.
- Changi, W. (2015). *Biosorption of Copper by Nepenthes Ampullaria-Associated-Endophytic Fungi*. (Thesis of Master of Science). Swinburne University of Technology. Australian.
- Choppala, G., Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Skinner, W. y Seshadri, B. (2013). Concomitant reduction and immobilization of chromium in relation to its bioavailability in soils. *Environ. Sci. Pollut.* 22, 8969–8978.
- Chen, Q., Luo Z., Hills C., Xue G., y Tyrer M. (2009). Precipitation of heavy metals from wastewater using simulated flue gas: sequent additions of fly ash, lime and carbon dioxide. *Water Residual*. 43, 2605- 2614.
- CONAMI – Confederación Nacional de Comunidades del Perú Afectadas por la Minería. (2010). La invasión de nuestros territorios: La expansión de las concesiones mineras en el centro del Perú. Recuperado de https://laultima reina.files.wordpress.com/2010/08/119_macrocentro.pdf
- CONGEO. (2018). *Carhuacayán*. Recuperado de: <https://congeo.es/service/carhuacayan/>
- Cursino, L., Mattos, S., Azevedo, V., Galarza, F., Bucker, H., Chartone E., y Nascimento, A. (2000). Capacity of mercury volatilization by mer (from

- Escherichia coli) and glutathione S-transferase (from Schistosoma mansoni) genes cloned in Escherichia coli. Science of Total Environment, 261(1-3), 109-113.
- Dancé J. y Saenz D. (2013). Estado de la situación y la gestión ambiental en el Perú. Universidad de San Martín de Porres. Primera versión.
- Davet, P., Rouxel, F., (2000). Detection and isolation of soil fungi. Science Publisher Inc. Enfield (NH), Plymouth.
- Delgadillo, A., González, C., Prieto, F., Villagómez, J. y Sandoval O. (2011). Phytoremediation: an alternative to eliminate pollution. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 14: 597- 612.
- De Rome L. y Gadd G. (1987). Copper adsorption by Rhizopus arrhizus, Cladosporium resinae and Penicillium italicum. Appl Microbiol Biotechnol 26:84–90.
- Donati, E. y Sand, W. (2007). Microbial processing of metal sulfides. UK: Springer.
- Enamorado, Y., Villanueva, M., Hernández, I., Coto, O., y Pomares, M. (2011). Caracterización de la biomasa inactiva de Aspergillus niger O-5 como sorbente de Pb (II). *Química Nova*, 34 (7) 1141-1146.
- Evans, L. (1989). Chemistry of metal retention by soils. Environmental Science and Technology. 23; 1046-1056.
- Espinoza, M., y Ludeña, K. (2007). *Lixiviación fúngica de cobre a partir de minerales del distrito minero Portovelo-Zaruma-Minas Nuevas*. (Tesis de pregrado). Universidad técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Ezzouhri L., Castro E., Moya M., Espinola F. y Lairini K. (2009) Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. African Journal of Microbiology Research. 3 (2): 035-048
- Fahr, M., Laplaze L., Bendaou, N., Hoher, El, V., D., Bogusz, y Smouni, A., (2013). Effecto fleadon root growth. *Frontiers in Plant Science*, 4 (175) 1.
- Figueroa, J. y Marino, M. (2001). *Química Física del Medio Ambiente*. 310p. Mexico: Reverté. S.A. Primera Edición.

- Frankenberger, W., y Karlson, U. (1995). Volatilization of selenium from a dewatered seleniferous sediment: a field study. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(3-4), 226-232.
- Gadd, G. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*. 156, 609–643.
- Gadd, G. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122 (2-4), 109-119.
- Gadd G. (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124, 25-60.
- Gadd, G. y Griffiths, A., (1978) Microorganisms and Heavy Metal Toxicity. *Microbial Ecology*. 4:303-317.
- García, I., y Dorronsoro, C. (2002). Contaminación por metales pesados. Departamento de edafología y química agrícola.
- García, C., Moreno, J., Hernández, T. y Polo, A., (2002). Metales pesados y sus implicancias en la calidad de suelo. *Ciencia y Medio Ambiente* pp 125 – 138.
- Gilis, A., Khan M, Cornelis P, Meyer J, Mergea M, Van der Lelie D. (1996). Siderophore mediated iron uptake in *Alcaligenes eutrophus* CH34 and identification of *aleB* encoding ferric-alcaligin E receptor. *J. Bact*, 178:5499-5507.
- Garbisu, C., Alkorta, I. (2003). Basic concept son heavy metal soil bioremediation. *European Journal of mineral processing and environmental protection*, 3: 58-66.
- Costa, J. 2004. Trends in Electrochemistry and Corrosion the Beginning of the 21st Century. Edicions Universitat Barcelona, 1241 pp.
- Harter, R. (1983). Effect of Soil pH on Adsorption of Lead, Copper, Zinc, and Nickel. *Soil Science Society of America*. 47:47-51.

- Huaranga, F., Méndez, E., Quilcat, V., y Huaranga, A. (2012). Contaminación por metales pesados en la Cuenca del Río Moche, 1980 – 2010, La Libertad – Perú. *Scientia Agropecuaria*, 3: 235 – 247.
- Ho J. y Hussein K. (2012). Heavy Metal Tolerance of Fungi Isolated from Contaminated Soil. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*. 45(4): 565-571.
- Hobman, J. y Brown, N. (1997). Bacterial mercuryresistance genes. *Metal Ion Biol*, 34:527-568.
- Iqbal, M., Y Asma S. (2007). Production of an inmovilized hibryd 82nvironment for the sorption of Ni (II) from aqueos solution. *Process Biochemetry* 42: 148-157.
- Iskandar N., Izzati N. y Tan S. (2011). Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*. 23(5): 824–830.
- Jara J. (2018). Desarrollo de una metodología de recuperación de suelos altamente contaminados con metales pesados utilizando remediación fisicoquímica y fitorremediación. Tesis de grado. Universidad Andrés Bello, Chile.
- Jaramillo, C., y Patiño, C. (2014). *Sistema de biosorción de metales pesados de los lixiviados del relleno sanitario la esmeralda de la ciudad de Manizales*. (Tesis de magister). Universidad de Manizales, Colombia.
- Juwarkar, A., Nair, A., Dubey, K., Singh, S. y Devotta, S. (2007). Biosurfactant technology for remedia tion of cadmium and lead contaminated soils. *Chemosphere*, 68:1996-2002.
- Johnson, D., y Hallberg K. (2005). Acid mine drainage remediation options. *Science of the Total Environment*, 338: 3 – 14.
- Jong, T. y Parry, D. (2003). Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research*, 37(14), 3379-3389.

- Khade S. y Adholeya A. (2007). Feasible Bioremediation through Arbuscular Mycorrhizal Fungi Imparting Heavy Metal Tolerance: A Retrospective. *Bioremediation Journal* 11, 33-43.
- Khan A., (2006) Mycorrhizoremediation an enhanced form of phytoremediation. *Journal Zhejiang* 7: 503-514.
- Kapoor, A. (1998.). *Removal of heavy metals from aqueous solution by fungi Aspergillus niger*. (Thesis of doctor) University of Regina, Canada.
- Karnib M., Kabbani A., Holail H. y Olama Z. (2014). Heavy Metals Removal Using Activated Carbon, Silica and Silica Activated Carbon Composite, *Energy Procedia*, Volume 50, 113-120.
- Kirchman, D. (2012). *Processes in microbial ecology*. UK: Oxford University Press.
- Lammoglia, T., Figueiredo B., Momoyo, A., Liane M., Akemi, I., y Kira, C. (2010). Lead and other trace elements in edibles and in topsoil as a pathway for human contamination in a mining area in Brazil. *TERRÆ*, 7(1-2):3-13.
- Llaczka H., Castellanos P. (2020). Hongos Filamentos de Relave Minero Contaminado con Plomo y Zinc. *Instituto de Investigación FIGMMG-UNMSM*. 23 (45): 37 – 42
- Lovley, D. y Lloyd, J. (2000). Microbes with a metal for bioremediation. *Nature Biotechnology*, 18: 600-601.
- Macias, G., (1993). *Formulación y nomenclatura en química inorgánica*: COU Badajoz 1^{ra} Ed. B. pp 224.
- Malagre A, Arante V, Medeiro C, y Machuca A. (2002). Production of metal chelating compounds by white rot fungi – root fungi, and their comparative abilities for pulp bleaching. *Enzyme and microbial Technology*. 30 : 562 – 565
- McBride S. y Hendershot W. (1997). Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science*. 48: 337-346

- Marrero J., Díaz A. y Coto O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la Biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41 (1): 67-78.
- Meza, P. (2013). *Evaluación de hongos resistentes a Cr (VI) y Zn (II) y su capacidad de 84nvironment84 en solución acuosa, aislados de ambientes mineros cercanos al río Yauli, Junin.*(Tesis del pregrado) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- MINAM. (2014). Guía para muestreo de suelos, Perú.
- Morales, D., y Ruiz, K. (2008.). *Determinación de la capacidad de remoción de cadmio, plomo y níquel por hongos de la podredumbre blanca inmovilizados.* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Morante G. (2002). Electrocoagulación de Aguas Residuales. *Revista Colombiana de Física*. 34 (2), 484-487.
- Munson, J., 2011. Cost of Faro's toxic tomb to top \$450 million. Yukon News, <http://www.yukon-news.com/news/11195/>
- Muñoz L., Olivera P., Santillán M., y Tamariz C. (2019). Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú). *Revista peruana de biología* 26(1): 109 – 118.
- Navarro A, Ramos K, Campos K, Maldonado H. (2006) Elucidación del efecto del pH en la adsorción de metales pesados mediante biopolímeros naturales: cationes divalentes y superficies activas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Volumen 7(2) 113 -126.
- Nemerow N. y Dasgupta A. (1998). Tratamiento de Vertidos Industriales Peligrosos. Ed. Dias de Santos. Madrid, 822 pp.
- ONU – DAES. (2015). Una historia de 10 años: La década del agua para la vida y lo que viene después. Recuperado de: <https://www.un.org/spanish/waterforlifedecade/pdf/WaterforLifeESP.pdf>

- Oyarzun, R., Higuera P., y Lillo, J. (2011). Minería Ambiental. Móstoles. España. GEMM – Aula2punto.net.
- Okino, S., Iwasaki, K., Yagi, O., & Tanaka, H. (2000). Development of a biological mercury removal-recovery system. *Biotechnology Letters*, 22(9), 783-788.
- Palacios, E. y Villavicencio, L. (2007.). *Biosorción de Metales Pesados en Solución Acuosa Mediante Biomasa de Saccharomyces Cerevisiae*. (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas Puebla, México.
- Pérez S. 2018. Impacto ambiental de la Compañía minera Southern Perú Cooper Corporation en América Latina: Una aproximación histórica de comienzos del siglo XX a la actualidad. *Revista Geográfica de América central*. 61 (3): 489 – 503
- Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 57:20-33.
- Pócsi, I. (2011). Toxic Metal/Metalloid Tolerance in Fungi. A Biotechnology Oriented Approach. En G. Banfalvi (Ed.) *Cellular Effects of Heavy Metals* (pp. 31-58). Springer.
- Poma, P. (2008). Intoxicación por plomo en humanos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 69: 2, 120-126.
- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana C., y Campos, A. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada*, 5: (1,2).
- Rawlings, E. y Silver, S. (1995). Mining with microbes. *Biotechnology*, 13, 773-738.
- Rajendran, P., Muthukrishnan, J., Gunasekaran, P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41: 935-944.
- Rieuwerts J., Thornton I., y Farago E. (1998). Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of

- a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 10:2, 61-75.
- Rajendran P, Muthukrishnan J. y Gunasekaran P. (2003) Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology* Vol.41: 935-944.
- Reyes, S., Alvares, J. (2007). Fungal bioleaching of metals in preservative treated wood. *Process biochemistry*. 42: 798-804.
- Reyes Y., Vergara I., Torres O., Díaz M., González E. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, Vol. 16 (2) 66-77. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6096110>
- Ribeiro, L. (2009). *Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de biotransformação e biorremediação*. (Tese do doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Ríos, E. (21 de enero de 2012). Carhuacayán en La Oroya en 4to. Lugar de pueblos contaminados. *Correo*. Recuperado de <https://diariocorreo.pe/ciudad/carhuacayan-en-la-oroya-en-4to-lugar-de-pueblos-contaminados-502623/>
- Rodríguez, F., y Pereira S. (2007). Ecologia e 86nvironmen de fungos filamentosos isolados de solo contaminado por metais pesados. *Brasileira de Biociências*, 5 (2) 903-905.
- Romero, A., Flores, S., y Medina, R. (2008). Estudio de los metales pesados en el relave abandonado. *Instituto de Investigaciones FIGMMG*, 11, (22), 13-16.
- Royal society of Canada. (1986). Lead in the 86nvironm 86nvironment, science and regulation. Ottawa, Canada: Commission on lead in the environment.
- SERVIDINI, Servicios en comunicación Intercultural. (2016). El río Mantaro se resiste a morir. Recuperado de: <https://www.servindi.org/actualidad-opinion/01/08/2016/el-rio-mantaro-se-resiste-morir>

- Schippers, A., y Sand, W. (1999). Bacterial leaching of metal sulfides procedes by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulphur. *Applied and Environmental. Microbiology*. 65(1), 319-321.
- Salman, H., Ibrahim M., Tarek M., y Sulaymon, A. (2014). Biosorption of Heavy Metals: A Review. *Journal of Chemical Science and Technology*, 3 (4) 74-102.
- Sánchez J., Marrugo J., Urango I., (2014) Biosorción simultanea de plomo y cadmio en solución acuosa por biomasa de hongos *Penicillium* sp. *TEMAS AGRARIOS*. 19 (1): 5 – 74
- Siddiquee S., Aishah S., Azad S., Shafawati S., Naher L. (2013). Tolerance and biosorption capacity of Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{3+} and Cu^{2+} by filamentous fungi (*Trichoderma harzianum*, *T. aureoviride* and *T. virens*). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4, 570-583.
- Solís J., Santana M., Aguilar M., Cavazos U., Cavazos A., Serrano J., Gómez H., y Aguilar B. (2015). Habilidad de *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* para Remover Iones Metálicos Zn^{2+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} . *Terra Latinoamericana*. 33: 189-198
- Sposito, G. (1989). *The chemistry of soil*. Oxford University Press. New York, NY, USA.
- Stephen, J., y Macnaughton, S. (1999). Developments in terrestrial remediation of metals. *Current Opinion in Biotechnology*. 10(3), 230-233.
- Sun F. y Shao Z. (2007). Biosorption and bioaccumulation of lead by *Penicillium* sp. Psf-2 isolated from the deep sea sediment of the Pacific Ocean. *Third Institute of Oceanography*. 11:853–858.
- Taylor J y Wiesner M. (2002). *Membranas. Capítulo 11. Calidad y Tratamiento del Agua. Manual de suministros de Agua Comunitaria*. McGraw Hill. Madrid, 707 – 779 pp.
- Tabak, H., Lens, P., Van Hullebusch, D., y Dejonghe, W. (2005). Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides–1. *Microbial processes and mechanisms*

- affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 4(3), 115-156.
- Vadkertiova R. y Slavikova E. (2006). Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *J. Basic Microbiol.* 46: 145 – 152.
- Valls, M., y De Lorenzo, V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 327-338.
- Velmurugan, N., Hwang, G., Sathishkumar M., Choi, T., Lee K., Taek, B., y Lee, Y. (2010). Isolation, identification, Pb(II) biosorption isotherms and kinetics of lead adsorbing *Penicillium* sp. MRF-1 from South Korean mine soil. *Journal of Environmental Sciences*, 22, (7) 1049-1056.
- Villanueva, J. (2015). *Determinación de la biorremoción de plomo (Pb+2) mediante hongos y microalgas nativas aisladas de efluentes industriales empacadas en un sistema en serie de agitación continua.* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú.
- Wan Ngah W., Teong L., Hanafiah M., (2011). Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review, *Carbohydrate Polymers*, 83, 1446 – 1456.
- White, C., Sharman, K. y Gadd, M. (1998). An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. *Nature Biotechnology*, 16(6), 572-575.
- Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L., Chengjiang, R. (2010). A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metal from contaminated soil: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal. Hazardous Materials*, 174:1-8.
- Zewail T. y Yousef N. (2015). Kinetic study of heavy metal ions removal by ion exchange in batch conical air spouted bed, *Alexandria Engineering Journal*, 54, 83-90.

Zucconi L., Ripa C., Alianiello F., Benedett A. y Onofri S. (2003). Lead resistance, sorption and accumulation in a *Paecilomyces lilacinus* strain. *Biol Fertil Soils*. 37:17–22

ANEXOS:

Anexo 1: Distribución de frecuencias del crecimiento y tolerancia de los hongos aislados de la cuadrícula 1, 2 y 3 en medio agar Czapeck plomo 1.25, 1.75 y 2.25 g/l, ANOVA y TUKEY.

Evaluación del crecimiento de los hongos aislados en cuadrícula 1 en agar Czapeck – plomo a tres concentraciones 1.25, 1.75 y 1.75 g/l.

1.25 g/l							
N	<i>Intervalos de Crecimiento</i>		<i>Crecimiento</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Frecuencia acumulada</i>	<i>% de Frecuencia</i>	<i>% acumulado</i>
1	4	17	17	20	20	53%	53%
2	17	30	30	7	27	18%	71%
3	30	43	43	5	32	13%	84%
4	43	56	56	0	32	0%	84%
5	56	69	69	2	34	5%	89%
6	69	82	82	2	36	5%	95%
7	82	95	95	2	38	5%	100%

Fuente. Elaborados por el autor.

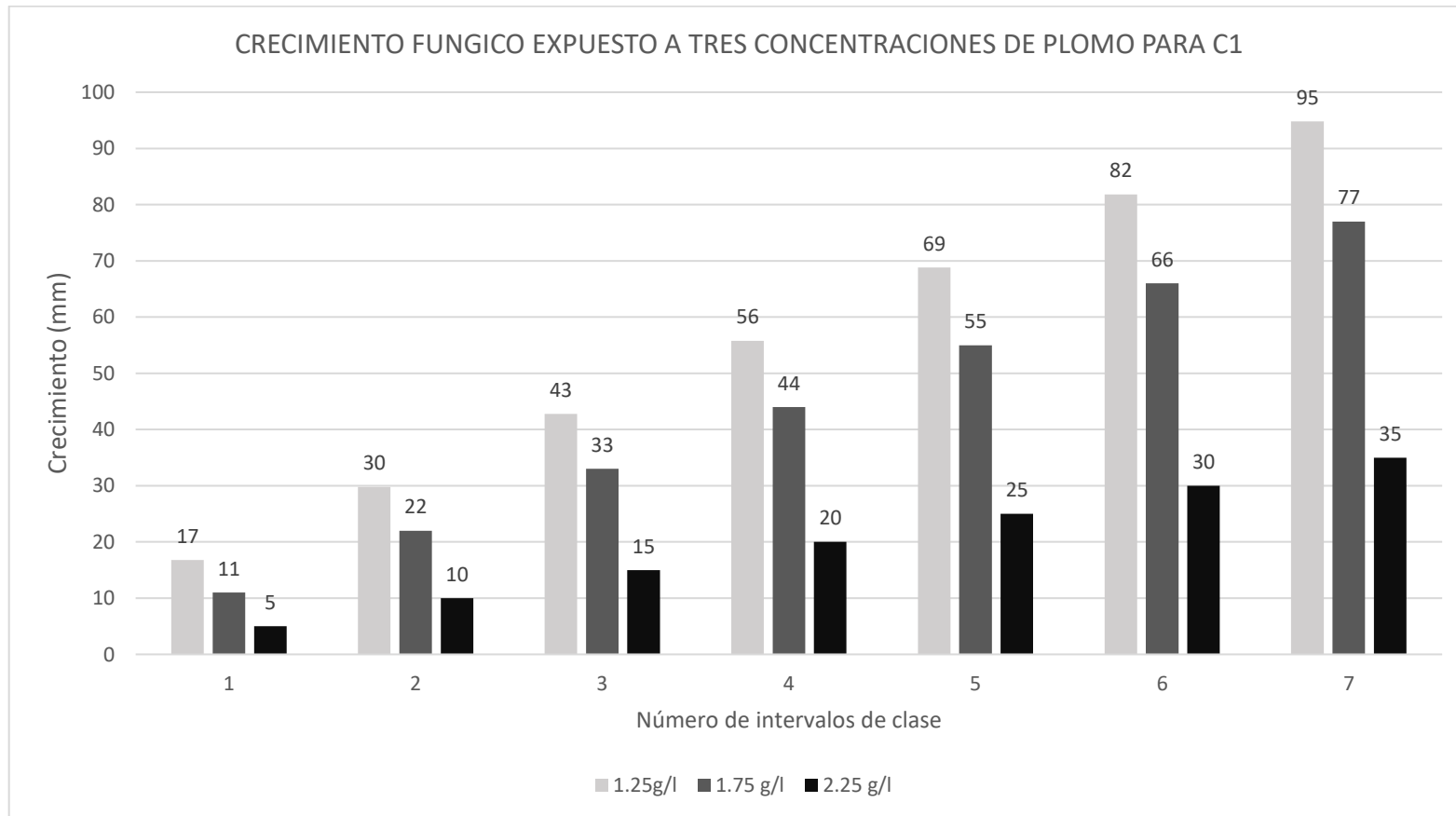
1.75 g/l							
N	<i>Intervalos de Clase</i>		<i>Crecimiento</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Frecuencia acumulada</i>	<i>% de Frecuencia</i>	<i>% acumulado</i>
1	0	11	11	24	24	63%	63%
2	11	22	22	5	29	13%	76%
3	22	33	33	4	33	11%	87%
4	33	44	44	2	35	5%	92%
5	44	55	55	0	35	0%	92%
6	55	66	66	1	36	3%	95%
7	66	77	77	2	38	5%	100%

Fuente. Elaborados por el autor.

2.25 g/l							
N	<i>Intervalos de Clase</i>		<i>Crecimiento</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Frecuencia acumulada</i>	<i>% de Frecuencia</i>	<i>% acumulado</i>
1	0	5	5	16	16	42%	42%
2	5	10	10	12	28	32%	74%
3	10	15	15	1	29	3%	76%
4	15	20	20	6	35	16%	92%
5	20	25	25	1	36	3%	95%
6	25	30	30	2	38	5%	100%
7	30	35	35	0	38	0%	100%

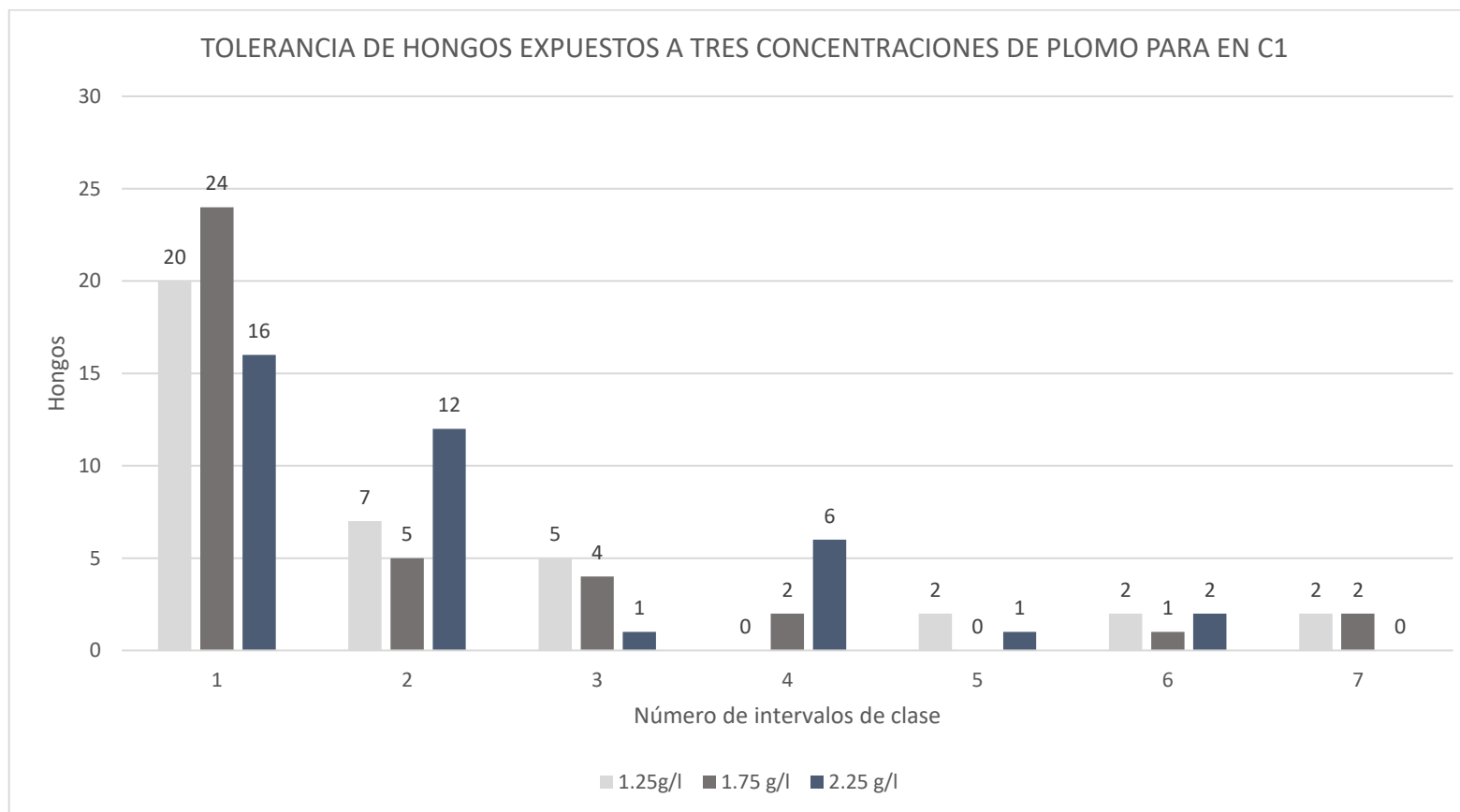
Fuente. Elaborados por el autor.

Influencia del plomo a tres concentraciones en el crecimiento vs los hongos evaluados para cuadrícula 1 (C1).



Fuente. Elaborados por el autor.

Evaluación de la tolerancia de los hongos frente a tres concentraciones de plomo para cuadrícula 1.



Fuente. Elaborados por el autor.

Análisis de varianza al 95% confianza, para determinar diferencias en el promedio de crecimiento en cuadrícula 1.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	6135.27	2	3067.64	9.45	0.0002	3.08
Dentro de los grupos	36038.20	111	324.67			
Total	42173.47	113				

Fuente. Elaborados por el autor.

Prueba de TUKEY para determinar la diferencia en el promedio de crecimiento en cuadrícula 1.

CUADRICULA 1				
HSD	Pb g/l	1.25	1.75	2.25
9.8	1.25		10	18
	1.75	10		8
	2.25	18	8	

Fuente. Elaborados por el autor.

Anexo 2: Distribución de frecuencias del crecimiento y tolerancia de los hongos aislados de la cuadrícula 2 en medio agar Czapeck plomo 1.25, 1.75 y 2.25 g/l, ANOVA y TUKEY.

Evaluación del crecimiento de los hongos aislados en cuadrícula 2 en agar Czapeck – plomo

1.25g/l							
N	Intervalos de Clase		Marca	Frecuencia	Frecuencia acumulada	% de Frecuencia	% acumulado
1	7	11	11	5	5	50%	50%
2	11	15	15	2	7	20%	70%
3	15	19	19	0	7	0%	70%
4	19	23	23	1	8	10%	80%
5	23	27	27	2	10	20%	100%

Fuente. Elaborados por el autor.

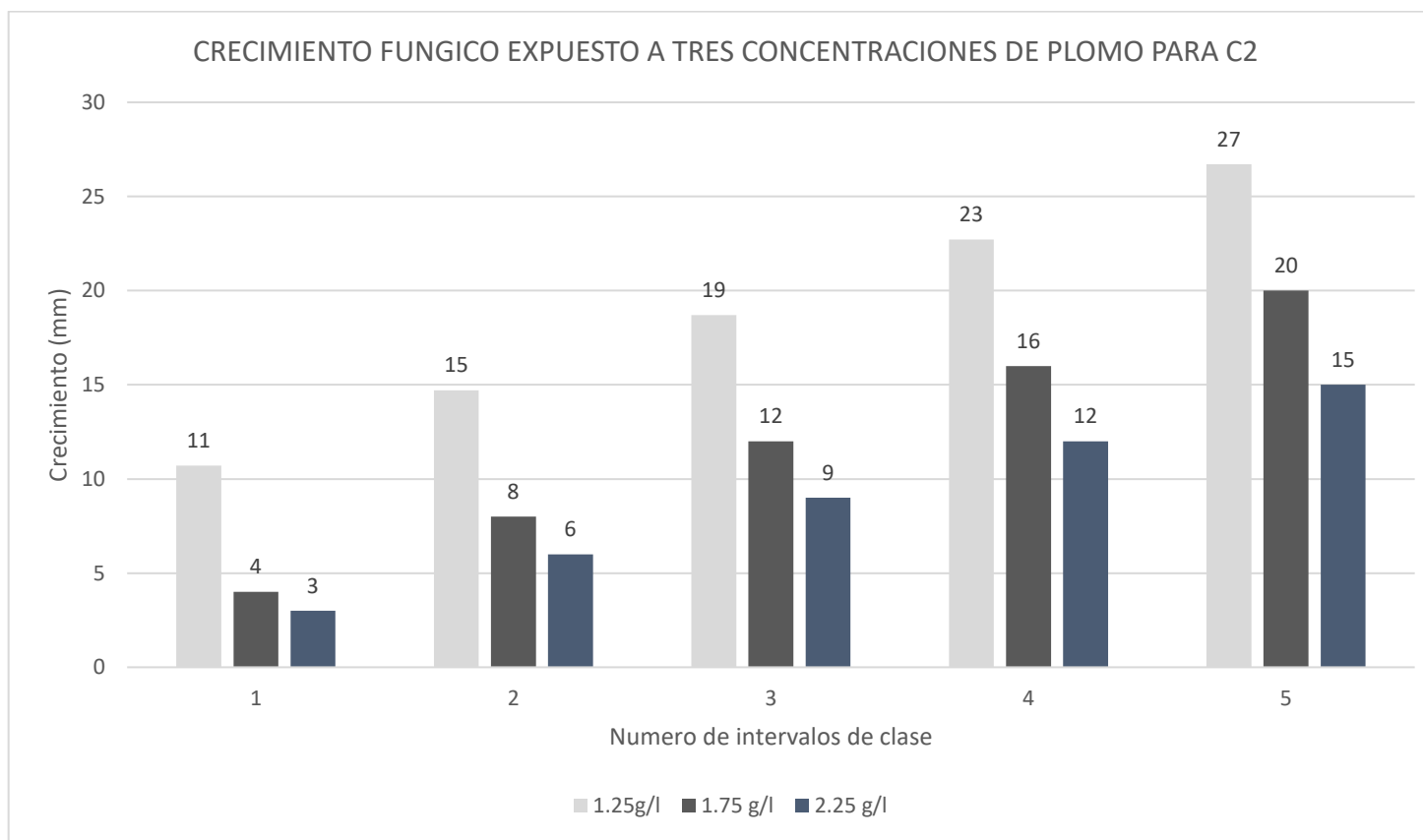
1.75 g/l							
N	Intervalos de Clase		Crecimiento	Frecuencia	Frecuencia acumulada	% de Frecuencia	% acumulado
1	0	4	4	5	5	50%	50%
2	4	8	8	0	5	0%	50%
3	8	12	12	3	8	30%	80%
4	12	16	16	2	10	20%	100%
5	16	20	20	0	10	0%	100%

Fuente. Elaborados por el autor.

2.25 g/l							
N	Intervalos de Clase		Crecimiento	Frecuencia	Frecuencia acumulada	% de Frecuencia	% acumulado
1	0	3	3	6	6	60%	60%
2	3	6	6	0	6	0%	60%
3	6	9	9	2	8	20%	80%
4	9	12	12	1	9	10%	90%
5	12	15	15	1	10	10%	100%

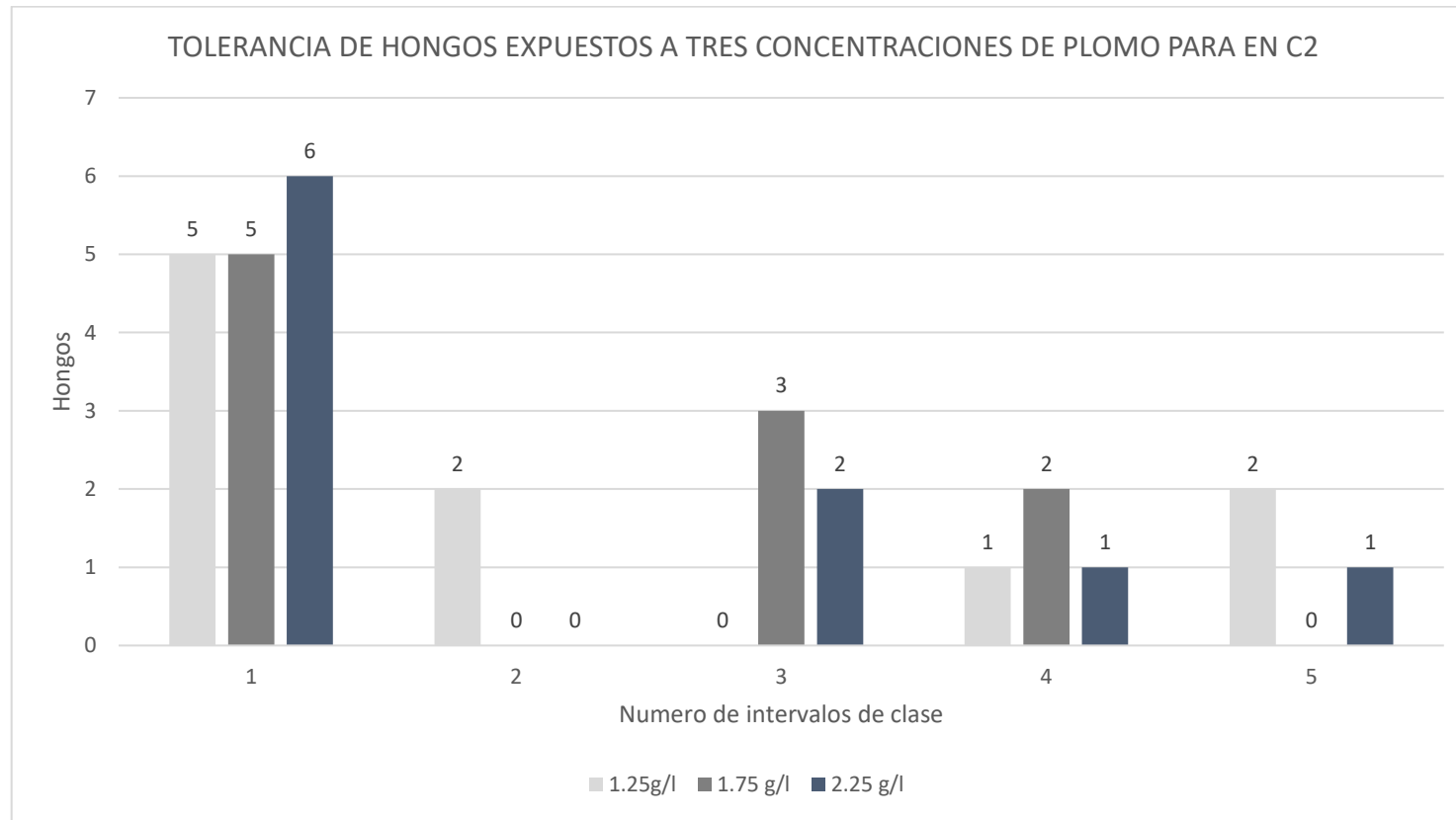
Fuente. Elaborados por el autor.

Influencia del plomo a tres concentraciones en el crecimiento vs los hongos evaluados para cuadrícula 2.



Fuente. Elaborados por el autor.

Evaluación de la tolerancia de los hongos frente a tres concentraciones de plomo, para cuadrícula 2.



Fuente. Elaborados por el autor.

Análisis de varianza al 95% confianza, para determinar diferencias en el promedio de crecimiento en cuadrícula 2.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	490.36	2	245.18	5.78	0.00812	3.35
Dentro de los grupos	1144.76	27	42.40			
Total	1635.12	29				

Fuente. Elaborados por el autor.

Prueba de TUKEY para determinar la diferencia en el promedio de crecimiento en cuadrícula 2.

CUADRICULA Nº 2				
HSD		1.25	1.75	2.25
7.19	1.25		7.23	9.48
	1.75	7.23		2.25
	2.25	9.48	2.25	

Fuente. Elaborados por el autor.

Anexo 3: Distribución de frecuencias del crecimiento y tolerancia de los hongos aislados de la cuadrícula 3 en medio agar Czapeck plomo 1.25, 1.75 y 2.25 g/l, ANOVA y TUKEY.

Evaluación del crecimiento de los hongos aislados en cuadrícula 3 en agar Czapeck – plomo 1.25, 1.75 y 2.25 g/l.

1.25g/l							
N	Intervalos de Clase		Crecimiento	Frecuencia	Frecuencia acumulada	% de Frecuencia	% acumulado
1	7	16	16	18	18	42%	42%
2	16	25	25	11	29	26%	67%
3	25	34	34	7	36	16%	84%
4	34	43	43	2	38	5%	88%
5	43	52	52	2	40	5%	93%
6	52.3	61	61	1	41	2%	95%
7	61.3	70	70	2	43	5%	100%

Fuente. Elaborados por el autor.

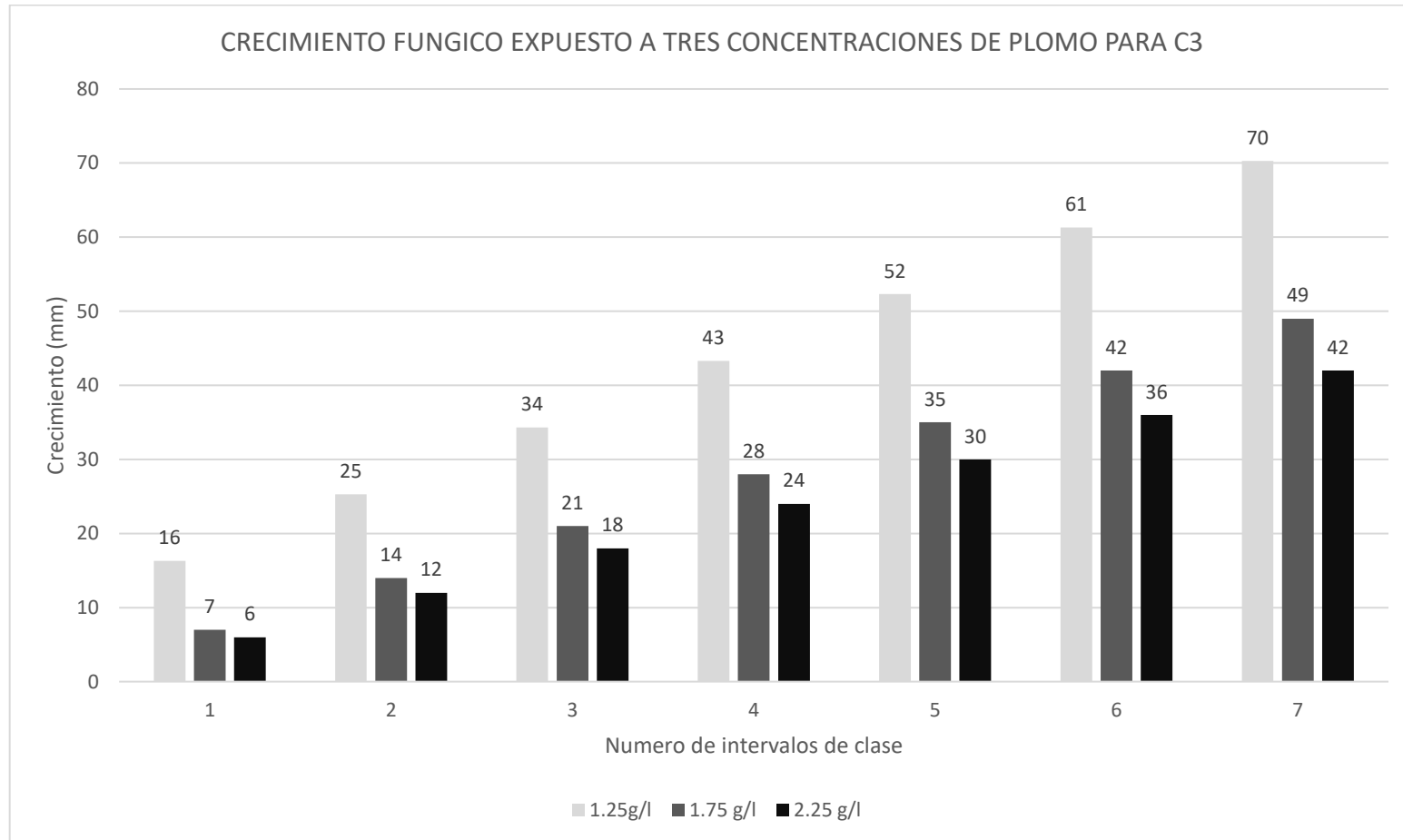
1.75 g/l							
N	Intervalos de Clase		Crecimiento	Frecuencia	Frecuencia acumulada	% de Frecuencia	% acumulado
1	0	7	7	5	5	12%	12%
2	7	14	14	24	29	56%	67%
3	14	21	21	5	34	12%	79%
4	21	28	28	4	38	9%	88%
5	28	35	35	3	41	7%	95%
6	35	42	42	1	42	2%	98%
7	42	49	49	1	43	2%	100%

Fuente. Elaborados por el autor.

2.25 g/l							
N	Intervalos de Clase		Crecimiento	Frecuencia	Frecuencia acumulada	% de Frecuencia	% acumulado
1	0	6	6	10	10	24%	24%
2	6	12	12	22	32	52%	76%
3	12	18	18	6	38	14%	90%
4	18	24	24	2	40	5%	95%
5	24	30	30	0	40	0%	95%
6	30	36	36	1	41	2%	98%
7	36	42	42	1	42	2%	100%

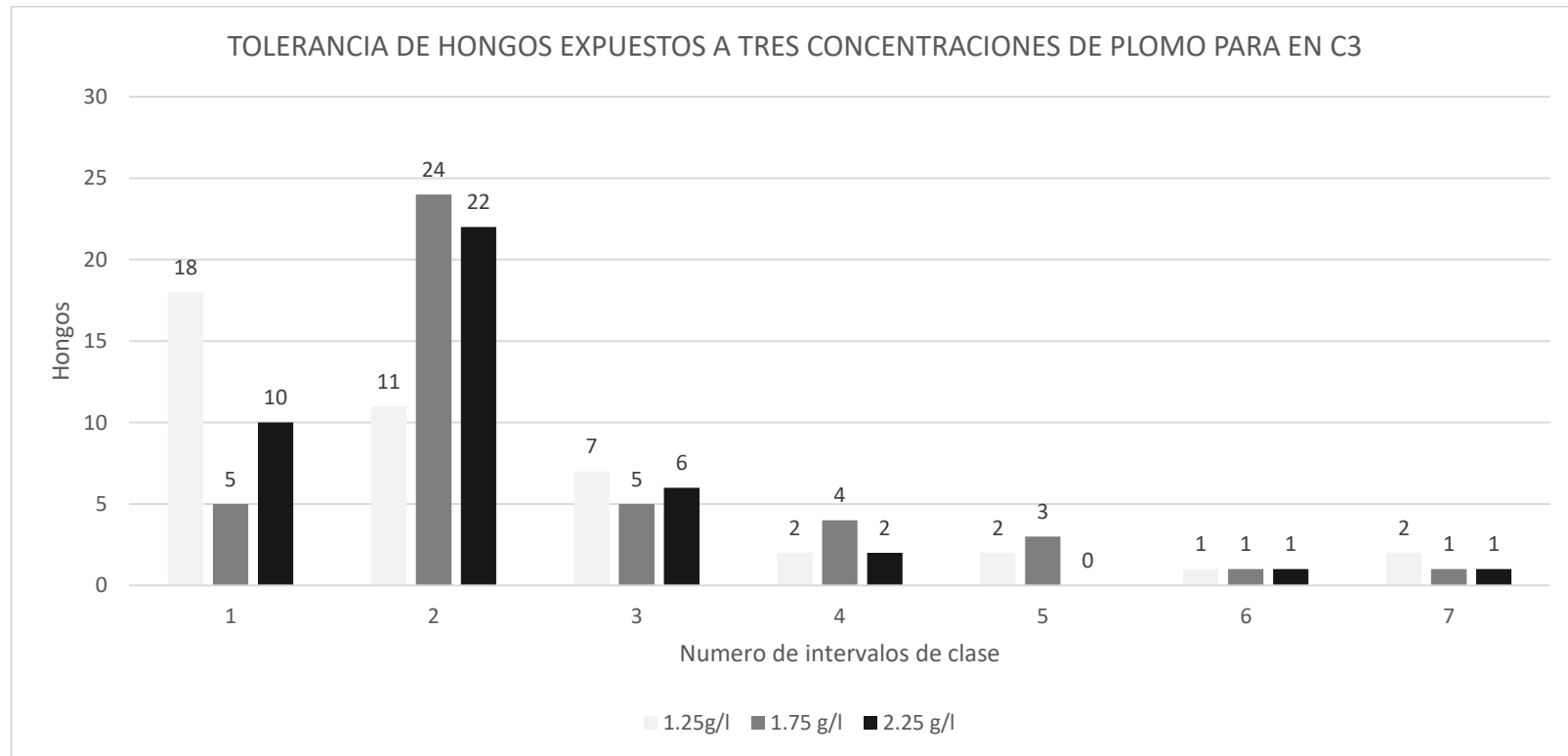
Fuente. Elaborados por el autor.

Influencia del plomo a tres concentraciones en el crecimiento vs los hongos evaluados cuadrícula 3.



Fuente. Elaborados por el autor.

Evaluación de la tolerancia de los hongos frente a tres concentraciones de plomo, cuadrícula 3.



Fuente. Elaborados por el autor.

Análisis de varianza al 95% confianza, para determinar diferencias en el promedio de crecimiento en C3.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4009.91	2	2004.95	16.16	0.00000057	3.07
Dentro de los grupos	15634.14	126	124.08			
Total	19644.04	128				

Fuente. Elaborados por el autor.

Prueba de TUKEY para determinar la diferencia en el promedio de crecimiento en C3.

CUADRICULA 3				
HSD		1.25	1.75	2.25
	1.25		9.03	13.39
5.62	1.75	9.03		4.36
	2.25	13.39	4.36	

Fuente. Elaborados por el autor.

Anexo 4 Medios de cultivo empleados en el trabajo.

Extracto de Levadura, peptona Glucosa (YPG)

Glucosa	40 g
Peptona	10 g
Cloranfenicol	1 mg
Penicilina	1 mg
Agua tri destilada	1000 ml
Ph	7

Agar papa dextrosa (APD)

Agar agar	17 g
Papa	300 g
Glucosa	20 g
Agua tridestilada	1000 ml
Ph	7

Caldo Czapeck - Dox – glucosa

Nitrato de sodio	1.0 g
Fosfato di potásico	0.5 g
Sulfato de magnesio	0.25 g
Cloruro de potasio	0.25 g
Sulfato férrico	5×10^{-3}
Glucosa	2.5
Agar-agar	17
Agua tri destilada	1 000 ml